

II

(Nelegislatīvi akti)

REGULAS

KOMISIJAS REGULA (ES) Nr. 175/2010

(2010. gada 2. marts),

ar ko īsteno Padomes Direktīvu 2006/88/EK attiecībā uz pasākumiem, lai kontrolētu *Crassostrea gigas* sugas austeru paaugstinātu mirstību saistībā ar austeru herpesvīrusa 1 μvar (OsHV-1 μvar) konstatēšanu

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Padomes 2006. gada 24. oktobra Direktīvu 2006/88/EK par akvakultūras dzīvniekiem un to produktiem izvirzītajām dzīvnieku veselības prasībām, kā arī par konkrētu ūdensdzīvnieku slimību profilaksi un kontroli⁽¹⁾, un jo īpaši tās 41. panta 3. punktu un 61. panta 3. punktu,

tā kā:

- (1) Direktīvā 2006/88/EK noteiktas dzīvnieku veselības prasības, kas piemērojamas akvakultūras dzīvnieku un to produktu laišanai tirgū. Tajā noteikti arī minimālie profilaktiskie pasākumi, kas jāpiemēro, ja ir aizdomas par ūdensdzīvnieku saslimšanu ar konkrētām slimībām, vai šādu slimību uzliesmojumu gadījumā.
- (2) Minētās direktīvas 41. pantā noteikts, ka dalībvalstīm jāveic atbilstīgi pasākumi, lai kontrolētu stāvokli jaunu slimību gadījumos un novērstu šādas slimības izplatīšanos. Jaunas slimības gadījumā attiecīgajai dalībvalstij nekavējoties jāinformē Komisija, dalībvalstis un EBTA dalībvalstis, ja konstatētie fakti ir epidemioloģiski nozīmīgi citai dalībvalstij.
- (3) Vairākās zonās Francijā un Īrijā 2008. gada pavasara beigās un vasarā konstatēja *Crassostrea gigas* sugas austeru ("Crassostrea gigas austeres") paaugstinātu mirstību. To skaidroja ar vairākiem nelabvēlīgiem vides faktoriem kombinācijā ar *Vibrio* ģints baktēriju klātbūtni un austeru herpesvīrusa 1 (OsHV-1) klātbūtni, ieskaitot jaunu minētā vīrusa genotipu OsHV-1 μvar, kas nesen identificēts.
- (4) Francijas iestādes informēja Komisiju, dalībvalstis un EBTA dalībvalstis par šo stāvokli un par pasākumiem,

kas veikti 2008. gada augustā, un par šo jautājumu 2008. gada septembrī informēja Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgo komiteju.

- (5) 2009. gada pavasarī Francijā, Īrijā un Normandijas salās atkal konstatēja paaugstinātu mirstību, kas bija saistīta ar iepriekš minēto faktoru kombināciju. Lai gan mirstības cēloņi vēl joprojām ir neskaidri, Īrijā un Apvienotajā Karalistē 2009. gadā veiktie izmeklējumi liecina, ka OsHV-1 μvar vīrusus būtiski ietekmē mirstību.
- (6) Minēto dalībvalstu un Normandijas salu iestādes informēja Komisiju par šo stāvokli un par veiktajiem pasākumiem, un par šo jautājumu vairākas reizes informēja Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgo komiteju.
- (7) Ierobežošanas pasākumi, ko veica minēto dalībvalstu un Normandijas salu kompetentās iestādes, lai kontrolētu stāvokli saistībā ar jauno slimību, galvenokārt bija balstīti uz to, lai ierobežotu *Crassostrea gigas* austeru pārvietošanu ārpus zonām, kurās konstatēta paaugstināta mirstība.
- (8) Ņemot vērā to, ka 2009. gadā konstatēja jaunās slimības atkārtotus gadījumus un ka tie var atkārtoties, kā arī turpmākas izplatīšanās risku 2010. gada pavasarī un vasarā, un pamatojoties uz gūto pieredzi, ir lietderīgi un ir nepieciešams paplašināt pasākumus, ko jau ir veikušas skartās dalībvalstis.
- (9) Lai nodrošinātu vienādus nosacījumus Direktīvas 2006/88/EK prasību īstenošanai attiecībā uz jaunām slimībām un lai nodrošinātu to, ka veiktie pasākumi nodrošinātu pietiekoši iedarbīgu aizsardzību pret turpmāku izplatīšanos, vienlaikus nenosakot nevajadzīgus ierobežojumus *Crassostrea gigas* austeru pārvietošanai, ir nepieciešams koordinēt šos pasākumus attiecībā uz šo jaunās slimības stāvokli Eiropas Savienības mērogā.

(¹) OV L 328, 24.11.2006., 14. lpp.

- (10) Pēc tam, kad kompetentās iestādes ir informētas par to, ka ir konstatēta *Crassostrea gigas* austeru paaugstināta mirstība, jāņem paraugi un jāveic testi, lai konstatētu vai izslēgtu OsHV-1 μvar klātbūtni.
- (11) Kad ir apstiprināta vīrusa genotipa OsHV-1 μvar klātbūtne, dalībvalstīm jāīsteno slimības kontroles pasākumi, ieskaitot robežzonas izveidi. Nosakot robežzonu, jāņem vērā konkrēti faktori, kas minēti šajā regulā. Minētie slimības kontroles pasākumi jāīsteno līdz dienai, kad pārbaudēs apstiprina, ka paaugstināta mirstība ir apturēta.
- (12) Jāierobežo *Crassostrea gigas* austeru pārvietošana ārpus robežzonas, lai mazinātu slimības izplatīšanās risku. Tomēr jānosaka dažas atkāpes gadījumos, kad slimības izplatīšanās risks nav liels. Šīs atkāpes attiecas uz tādu konkrētu *Crassostrea gigas* austeru pārvietošanu, kuras paredzētas nosūtīšanai uz audzēšanas zonām vai izklāšanas zonām citā robežzonā vai kuras ir paredzētas lietošanai pārtikā. Lai nodrošinātu tādu *Crassostrea gigas* austeru sūtījumu izsekojamību, kuri ir paredzēti nosūtīšanai uz audzēšanas zonām vai izklāšanas zonām, tiem jāpievieno dzīvnieku veselības sertifikāts. Aizpildot sertifikātu, jāņem vērā skaidrojošās piezīmes, kas minētas V pielikumā Komisijas 2008. gada 12. decembra Regulai (EK) Nr. 1251/2008, ar ko īsteno Padomes Direktīvu 2006/88/EK attiecībā uz nosacījumiem un sertifikācijas prasībām par akvakultūras dzīvnieku un to produktu laišanu tirgū un importu Kopienā un nosaka pārnēsātājsugu sarakstu ⁽¹⁾.
- (13) Lai iegūtu vairāk informācijas par šīs jaunās slimības stāvokli Savienībā un it īpaši dalībvalstīs un iecirkņos, kas vēl nav šīs slimības skarti, un lai nodrošinātu OsHV-1 μvar agrīnu konstatēšanu, dalībvalstis var vēlēt izveidot programmas, kuru mērķis būtu paraugu ņemšana un testu veikšana OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai. Uz *Crassostrea gigas* austerēm, kas ir no zonām, kurās 2009. gadā īstenoti ierobežošanas pasākumi saskaņā ar attiecīgajā valstī noteiktajiem pasākumiem vai 2010. gadā – saskaņā ar šo regulu, jāattiecinā papildu dzīvnieku veselības prasības, ja šīs austeres ievestas audzēšanai vai izklāšanai dalībvalstīs vai iecirkņos, uz kuriem attiecas šāda programma, ja vien minētajā dalībvalstī vai iecirknī nav konstatēts OsHV-1 μvar.
- (14) Lai nodrošinātu to, ka dažādās dalībvalstīs dati, kas apkopoti saistībā ar programmām, kuras paredz paraugu ņemšanu un testu veikšanu OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai, būtu salīdzināmi, jānosaka konkrētas prasības par šādu programmu saturu.
- (15) Tas, ka ir ātri ir pieejama precīza informācija par stāvokli saistībā ar OsHV-1 μvar konstatēšanu dalībvalstīs, ir svarīgi, lai efektīvi kontrolētu stāvokli jaunās slimības gadījumos. Tāpēc dalībvalstīm bez liekas kavēšanās jāinformē Komisija un pārējās dalībvalstis par pirmo apstiprināto OsHV-1 μvar vīrusa klātbūtnes gadījumu savas valsts teritorijā 2010. gadā.
- (16) Turklāt jāizmanto informācijas lapas internetā, kas izveidotas saskaņā ar 10. pantu Komisijas 2008. gada 31. oktobra Lēmumā 2009/177/EK, ar ko ievieš Padomes Direktīvu 2006/88/EK attiecībā uz uzraudzības un izskaušanas programmām un slimības neskartu dalībvalstu, zonu un iecirkņu statusu ⁽²⁾.
- (17) Lai nodrošinātu pārredzamību un to, ka ir ātri pieejama svarīga informācija par jaunās slimības stāvokli, dalībvalstīm jāsniedz Komisijai un pārējām dalībvalstīm informācija par robežzonām, zonām, kurās iepriekš piemēroti ierobežošanas pasākumi, bet kurās ir pierādīts, ka šajās zonās vairs nav OsHV-1 μvar, un kurās ir izveidotas programmas OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai.
- (18) Saistībā ar jaunās slimības stāvokli ir daudz neskaidrību, tādēļ šajā regulā noteiktie pasākumi jāpiemēro līdz 2010. gada beigām.
- (19) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIENĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Definīcija

Šajā regulā OsHV-1 μvar nozīmē austeru herpesvīrusa 1 (OsHV-1) genotipu, kas definēts, pamatojoties uz daļējas sekvences datiem, kas uzrāda sistemātisku 12 bāzu pāru delēciju genoma ORF 4, salīdzinot ar OsHV-1 (GenBank # AY509253).

2. pants

Paraugu ņemšana, testēšana un robežzonu izveide

1. Ja konstatē *Crassostrea gigas* sugas austeru ("Crassostrea gigas austeres") paaugstinātu mirstību, kompetentā iestāde:

a) ņem paraugus saskaņā ar I pielikuma A daļu;

b) veic testu, lai noteiktu OsHV-1 μvar klātbūtni, saskaņā ar I pielikuma B daļā minētajām diagnostikas metodēm.

⁽¹⁾ OV L 337, 16.12.2008., 41. lpp.

⁽²⁾ OV L 63, 7.3.2009., 15. lpp.

2. Ja 1. punkta b) apakšpunktā minētā testa rezultātā konstatē OsHV-1 ūvar klātbūtni, kompetentā iestāde izveido robežzonu. Minēto zonu definē, pamatojoties uz konkrētā gadījuma analīzi, ņemot vērā faktoros, kas ietekmē slimības izplatīšanās risku, kā minēts I pielikuma C daļā.

3. Dalībvalstis bez liekas kavēšanās informē Komisiju un pārējās dalībvalstis par pirmo robežzonu, kas izveidota attiecīgās valsts teritorijā 2010. gadā.

3. pants

Prasības tādu *Crassostrea gigas* austeru laišanai tirgū, kuras ir no 2. pantā minētās robežzonas

1. *Crassostrea gigas* austeres no robežzonām, kas izveidotas saskaņā ar 2. panta 2. punktu, nepārvieto ārpus šīm zonām.

2. Atkāpjoties no 1. punkta, *Crassostrea gigas* austeres drīkst pārvietot ārpus robežzonas, ja:

a) tās ir paredzētas nosūtīšanai uz citu robežzonu, kas izveidota saskaņā ar 2. panta 2. punktu;

b) tās ir no robežzonas daļas (ieskaitot audzētavas), kuru nav skārusi paaugstināta mirstība, un sūtījumam:

i) ir ņemti paraugi saskaņā ar I pielikuma A daļu; un

ii) veikti testi, lai noteiktu OsHV-1 ūvar klātbūtni, saskaņā ar I pielikuma B daļā minētajām diagnostikas metodēm;

c) pirms lietošanas pārtikā tās ir paredzētas turpmākai apstrādei, attīrīšanas centriem, nosūtīšanas centriem vai līdzīgiem uzņēmumiem, kuros ierīkota notekūdeņu attīrīšanas sistēma, ko validējusi kompetentā iestāde un kas:

i) deaktivizē apvalka vīrusus; vai

ii) līdz pieņemamam līmenim samazina iespējamību, ka slimības varētu pārnest uz dabiskajiem ūdeņiem;

d) tās ir paredzētas lietošanai pārtikā un ir šim nolūkam iepakotas un marķētas saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 853/2004⁽¹⁾ un:

i) vairs nespēj izdzīvot, ja tās izlaistu atpakaļ to dabiskajā vidē; vai

ii) ir paredzētas turpmākai apstrādei bez pagaidu uzglabāšanas apstrādes vietā;

e) sūtījumiem vai to produktiem, kas paredzēti lietošanai pārtikā bez papildu apstrādes, ar nosacījumu, ka tie iesaiņoti

mazumtirdzniecības iesaiņojumos, kuri atbilst Regulas (EK) Nr. 853/2004 noteikumiem par šādiem iesaiņojumiem.

3. Šā panta 2. punkta a) un b) apakšpunktā minētajiem sūtījumiem, kuri ir paredzēti nosūtīšanai uz audzēšanas zonām vai izklāšanas zonām, pievieno dzīvnieku veselības sertifikātu, kas aizpildīts saskaņā ar šīs regulas II pielikumā iekļauto paraugu un Regulas (EK) Nr. 1251/2008 V pielikumā minētajām skaidrojošajām piezīmēm.

4. pants

2. un 3. pantā paredzēto pasākumu atcelšana

Kompetentā iestāde var atcelt kontroles pasākumus attiecībā uz robežzonām, kas izveidotas saskaņā ar 2. panta 2. punktu, un ierobežojumus attiecībā uz laišanu tirgū, kas paredzēti 3. pantā, pēc tam, kad tā ik pēc 15 dienām veikusi divas secīgas pārbaudes, kas apliecina, ka paaugstināta mirstība ir apturēta.

5. pants

Prasības tādu *Crassostrea gigas* austeru laišanai tirgū, kuras ir no iecirkņa, kurā agrāk piemēroti kontroles pasākumi saistībā ar *Crassostrea gigas* austeru paaugstinātu mirstību OsHV-1 ūvar vīrusa dēļ

1. Uz *Crassostrea gigas* austerēm, ko laiž tirgū un kuras ir no iecirkņa, kurā 2009. vai 2010. gadā ir piemēroti ierobežošanas pasākumi saistībā ar *Crassostrea gigas* austeru paaugstinātu mirstību OsHV-1 ūvar vīrusa dēļ, attiecas šādi noteikumi:

a) tām pievieno dzīvnieku veselības sertifikātu, kas aizpildīts saskaņā ar šīs regulas II pielikumā iekļauto paraugu un Komisijas Regulas (EK) Nr. 1251/2008 V pielikumā minētajām skaidrojošajām piezīmēm, ja šie dzīvnieki:

i) ir paredzēti nosūtīšanai uz dalībvalstīm vai iecirkņiem, kur ir izveidota programma OsHV-1 ūvar agrīnai konstatēšanai un kur nav konstatēta OsHV-1 ūvar klātbūtne; un

ii) ir paredzēti nosūtīšanai uz audzēšanas zonām vai izklāšanas zonām;

b) tās ir no iecirkņa, kur, ņemot paraugus un veicot testus saskaņā ar I pielikuma A daļu, ir pierādīts, ka šajā iecirknī nav OsHV-1 ūvar; un

c) tās atbilst dzīvnieku veselības prasībām, kas minētas a) apakšpunktā iekļautajā sertifikāta paraugā.

2. Šā panta 1. punkta a) apakšpunkta i) punktā minētā programma OsHV-1 ūvar agrīnai konstatēšanai atbilst šādām prasībām:

a) par programmu jāpaziņo Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgajai komitejai;

⁽¹⁾ OV L 139, 30.4.2004., 55. lpp.

b) šāds paziņojums jāiesniedz atbilstoši Lēmuma 2009/177/EK II pielikumā iekļautās parauga veidlapas 1. punktu, 5.1., 5.2., 5.3., 5.5. un 5.9. punktu un 6. un 7. punktu;

c) programmā jāiekļauj:

i) paraugu ņemšana saskaņā ar I pielikuma A daļu;

ii) testu veikšana, lai noteiktu OsHV-1 ņivar klātbūtni, saskaņā ar I pielikuma B daļā minētajām diagnostikas metodēm.

3. Šā panta 1. punktu piemēro vienu nedēļu pēc dienas, kad notikusi Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgās komitejas sanāksme, kurā saņemts paziņojums par 1. punkta

a) apakšpunkta i) punktā minēto programmu.

6. pants

Informācijas lapa internetā

1. Dalībvalstis iesniedz Komisijai un pārējām dalībvalstīm:

a) robežzonu sarakstu un to faktoru sarakstu, kuri ņemti vērā, definējot šādas zonas, ieskaitot attiecīgās zonas ģeogrāfisko robežu aprakstu, kas izveidota saskaņā ar 2. panta 2. punktu;

b) iecirkņu sarakstu, ieskaitot attiecīgās zonas ģeogrāfisko robežu aprakstu:

i) kur 2009. gadā ir piemēroti ierobežošanas pasākumi saistībā ar *Crassostrea gigas* austeru paaugstinātu mirstību OsHV-1 ņivar vīrusa dēļ;

ii) kur, veicot testus saskaņā ar I pielikuma A un B daļu paraugiem, kuri ņemti šajā robežzonā, ir pierādīts, ka šajā iecirknī nav OsHV-1 ņivar;

c) paziņojumus par 5. panta 2. punktā minētajām programmām, ieskaitot attiecīgās zonas ģeogrāfisko robežu aprakstu.

2. Šā panta 1. punktā minēto informāciju regulāri atjaunina un publicē informācijas lapās, kas izveidotas internetā saskaņā ar Lēmuma 2009/177/EK 10. pantu.

7. pants

Ziņojumu iesniegšana

Dalībvalstis vēlākais līdz 2010. gada 1. oktobrim iesniedz ziņojumu Komisijai par programmām, par ko paziņots saskaņā ar 5. panta 2. punktu.

Ziņojumu izstrādā atbilstoši Lēmuma 2009/177/EK VI pielikumā iekļautajam veidlapas paraugam.

8. pants

Stāšanās spēkā un piemērošana

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī.

To piemēro no 2010. gada 15. marta līdz 2010. gada 31. decembrim.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2010. gada 2. martā

Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs
José Manuel BARROSO

I PIELIKUMS

A DAĻA

Paraugu ņemšana

1. 2. pantā paredzētā paraugu ņemšana

2. pantā paredzētajos paraugos iekļautas vismaz 12 *Crassostrea gigas* austeres. Izvēloties minētos dzīvniekus, paraugam ņem novājinātas, atvērušās vai nesen mirušas (nesadalījušās) austeres, un tās savāc iecirknī, kur novērota mirstība.

2. 3. panta 2. punkta b) apakšpunktā, 5. panta 1. punkta b) apakšpunktā un 2. punktā paredzētā paraugu ņemšana

a) 3. panta 2. punkta b) apakšpunktā paredzētajos paraugos:

i) kāpuriem uz vienu sūtījumu iekļauti pieci apvienotie paraugi, kuros ir vismaz 50 mg veselu dzīvnieku, kas savākti 4 līdz 8 dienas pēc apaugļošanas, ieskaitot čaulu;

ii) jaunajām austerēm, kas mazākas par 6 mm, uz vienu sūtījumu iekļauti 30 apvienotie paraugi, kuros ir vismaz 300 mg veselu dzīvnieku, ieskaitot čaulu;

iii) austerēm, kas lielākas par 6 mm, uz vienu sūtījumu iekļauti 150 dzīvnieki.

Izvēloties minētos dzīvniekus, paraugā jābūt proporcionāli pārstāvētām visām sūtījuma daļām. Ja sūtījumā ir novājinātas, atvērušās vai nesen mirušas (nesadalījušās) austeres, tad vispirms izvēlas šādas austeres.

b) 5. panta 2. punktā paredzētajos paraugos katrā paraugu ņemšanas vietā iekļautas vismaz 150 *Crassostrea gigas* austeres. Paraugus ņem visās tajās dalībvalstīs vai iecirkņā audzētavās vai gliemju audzēšanas zonās, kurās piemēro programmu.

5. panta 1. punkta b) apakšpunktā paredzētajos paraugos katrā iecirknī iekļautas vismaz 150 *Crassostrea gigas* austeres.

Izvēloties minētos dzīvniekus, ņem vērā šādus kritērijus:

— ja sūtījumā ir novājinātas, atvērušās vai nesen mirušas (nesadalījušās) austeres, tad vispirms izvēlas šādas austeres. Ja sūtījumā nav šādu dzīvnieku, izvēlas dzīvniekus, kuru vidū ir veselīgas gliemenes, kas jaunākas par 12 gadiem,

— ja paraugus ņem audzētavās, kurās ražošanā izmanot vairāk nekā vienu ūdenskrātuvi, paraugā iekļauj dzīvniekus no katras ūdenskrātuves tā, lai paraugā būtu proporcionāli pārstāvētas visas audzētavas daļas,

— ja paraugus ņem gliemju audzēšanas zonās, paraugā iekļauj dzīvniekus no pietiekoša paraugu ņemšanas vietu skaita, t. i., vismaz no trim paraugu ņemšanas vietām, tā, lai paraugā būtu proporcionāli pārstāvētas visas gliemju audzēšanas zonas daļas, ieskaitot dabiskas gliemju gultnes, kuras atrodas gliemju audzēšanas zonā. Izvēloties šīs paraugu ņemšanas vietas, jāņem vērā šādi galvenie faktori: tas, vai šajā zonā iepriekš ir konstatēts OsHV-1 ņivar vīruss, populācijas blīvums, ūdens plūsmas, dziļuma mērījumi un audzēšanas metodes.

c) 5. panta 2. punktā paredzētos paraugus ņem tajā gada periodā, kad ir zināms, ka dalībvalstī vai iecirknī ir vislielākā OsHV-1 ņivar izplatība. Ja šādu datu nav, paraugus ņem uzreiz pēc tā perioda beigām, kad ūdens temperatūra ir augstāka par 16 °C, vai tajā gada periodā, kad parasti ir gada visaugstākā temperatūra.

d) 5. panta 1. punkta b) apakšpunktā paredzētos paraugus, vēlams, ņem c) apakšpunktā minētajā gada periodā. Ja paraugus ņem citā gada periodā, nevis iepriekš minētajā, paraugam izvēlētās austeres līdz testēšanai jāuzglabā apstākļos, kas ir līdzvērtīgi c) apakšpunktā minētajiem apstākļiem, tik ilgu laiku, kāds ir pietiekams, lai konstatētu OsHV-1 ņivar.

B DAĻA

Diagnostikas metodes OsHV-1 μvar konstatēšanai1. *Piemērošanas joma*

Šī procedūra skaidro standarta diagnostikas metodes, kas jāizmanto OsHV-1 μvar konstatēšanai un identificēšanai ar polimerāzes ķēdes reakciju ("PCR"). Tā ļauj atšķirt OsHV-1 no OsHV-1 μvar.

Vajadzības gadījumā, lai optimizētu reakcijas apstākļus un lai pielāgotu šo metodi laboratorijā pieejamajām iekārtām un apstākļiem, laboratorijas drīkst piemērot grozījumus šajā pielikumā aprakstītajai metodei ar nosacījumu, ka var uzrādīt līdzvērtīgu jutīgumu un specifiskumu.

2. *Definīcija*

OsHV-1 μvar ir definēts šīs regulas 1. pantā.

3. *Iekārtas un vides apstākļi*

Lai veiktu diagnostikas testu OsHV-1 μvar konstatēšanai un identificēšanai ar PCR, ir vajadzīgas šādas iekārtas un šādi vides apstākļi, ko parasti izmanto, veicot noteikšanu ar PCR:

— velkmes skapis, kas aprīkots ar UV staru sistēmu, lai novērstu iespējamu kontaminēšanu, gatavojot PCR maisījumu,

— divi pilni pipešu komplekti (2 μl, 20 μl, 200 μl un 1 000 μl), pirmais DNS ekstrakcijai un otrs – PCR maisījuma sagatavošanai,

— trīs dažādas pipetes: viena pipete (2 μl), lai sadalītu paraugus PCR maisījumā, viena pipete (20 μl) etidija bromīda (EB) paraugu ņemšanai un vēl viena pipete (20 μl), lai ievietotu PCR produktus agarozes gelos,

— pipešu uzgaļi ar filtru (2 μl, 20 μl, 200 μl un 1 000 μl) DNS ekstrakcijai, PCR maisījuma sagatavošanai un paraugu sadalīšanai,

— pipešu uzgaļi (20 μl) EB paraugu ņemšanai un amplifikācijas produktu ievietošanai agarozes gelā,

— DNS amplifikators amplifikācijas veikšanai,

— horizontālā elektroforēzes sistēma PCR produktu elektroforēzei,

— UV gaismas galds PCR produktu novērošanai pēc agarozes gela elektroforēzes,

— sistēma gelu attēlu iegūšanai.

Veicot visus turpmāk minētos dažādos testu posmus, laboratorijas darbiniekam jābūt ģērbtam laboratorijas uzsvārcī un jālieto cimdi. Uzsvārci un cimdus vēlam mainīt pēc katra galvenā posma: DNS ekstrakcijas, PCR maisījuma sagatavošanas, paraugu sadalīšanas, amplifikācijas un ievietošanas gelā.

Šos dažādos posmus ir ieteicams veikt dažādās telpās. Konkrēti, amplifikācija un ievietošana gelā/elektroforēze jāveic citā telpā, nekā DNS ekstrakcija, PCR maisījuma sagatavošana un paraugu sadalīšana.

4. *Procedūra*4.1. *Parauga sagatavošana*

Dzīvas vai nesen mirušas (nesadalījušas) austeres, kuras iepriekš sasaldētas, apstrādā, lai veiktu DNS ekstrakciju.

Dažāda lieluma paraugus apstrādā atšķirīgi:

- a) kāpuriem apvienotajiem paraugiem, kuros ir 50 mg veselu dzīvnieku (ieskaitot čaulu), pievieno 200 µl destilēta ūdens, samaļ un centrifugē pie 1 000 g 1 minūti;
- b) jaunajām austerēm, kas mazākas par 6 mm, apvienotajiem paraugiem, kuros ir 300 mg veselu dzīvnieku (ieskaitot čaulu), pievieno 1 200 µl destilēta ūdens, samaļ un centrifugē pie 1 000 g 1 minūti;
- c) jaunajām austerēm, kuru izmērs ir no 6 līdz 15 mm, katra dzīvnieka mīkstos audus samaļ atsevišķi;
- d) dzīvniekiem, kas lielāki par 15 mm, izolē žaunu un apvalka daļas.

DNS ekstrakciju veic, izmantojot *QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)* un ievērojot audu testu protokola instrukcijas.

Tālāk paraugu sagatavo šādā secībā.

1. Ievieto 100 µl centrifugāta (paraugiem, kuri minēti a) un b) apakšpunktā) vai 10–50 mg audu (paraugiem, kuri minēti c) un d) apakšpunktā) 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā un pievieno 180 µl ATL bufera.
2. Pievieno 20 µl proteināzes K, samaisa vorteksā un inkubē 56 °C, līdz audi ir pilnībā sadalījušies (pa nakti). Inkubācijas laikā pa reizei samaisa vorteksā, lai disperģētu paraugu. Īsu brīdi centrifugē 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā, lai atbrīvotu vāciņu no pilieniem.
3. Paraugam pievieno 200 µl AL bufera, samaisa vorteksā impulsa režīmā 15 s un inkubē 70 °C 10 minūtes. Īsu brīdi centrifugē 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā, lai atbrīvotu vāciņu no pilieniem.
4. Paraugam pievieno 200 µl etanola (96–100 %) un samaisa vorteksā impulsa režīmā 15 s. Īsu brīdi centrifugē 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā, lai atbrīvotu vāciņu no pilieniem.
5. Maisījumu, kas iegūts 4. solī, uzmanīgi ievieto *QIAamp* centrifūgas kolonnā (2 ml savākšanas stobriņā), nesamitrinot maliņu. Noslēdz vāciņu un centrifugē pie 10 000 rpm 1 min. Ievieto *QIAamp* centrifūgas kolonnu tīrā 2 ml savākšanas stobriņā (ir testēšanas komplektā) un aizvāc stobriņu, kurā ir filtrāts.
6. Uzmanīgi atver *QIAamp* centrifūgas kolonnu un pievieno 500 µl AW1 bufera, nesamitrinot maliņu. Noslēdz vāciņu un centrifugē pie 10 000 rpm 1 min. Ievieto *QIAamp* centrifūgas kolonnu tīrā 2 ml savākšanas stobriņā (ir testēšanas komplektā) un aizvāc savākšanas stobriņu, kurā ir filtrāts.
7. Uzmanīgi atver *QIAamp* centrifūgas kolonnu un pievieno 500 µl AW2 bufera, nesamitrinot maliņu. Noslēdz vāciņu un centrifugē pie vislielākā apgriezīgu skaita (14 000 rpm) 3 min.
8. (Nav obligāti) ievieto *QIAamp* centrifūgas kolonnu jaunā 2 ml savākšanas stobriņā (nav testēšanas komplektā) un aizvāc savākšanas stobriņu, kurā ir filtrāts. Centrifugē pie vislielākā apgriezīgu skaita (14 000 rpm) 1 min.
9. Ievieto *QIAamp* centrifūgas kolonnu tīrā 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā (nav testēšanas komplektā) un aizvāc savākšanas stobriņu, kurā ir filtrāts. Uzmanīgi atver *QIAamp* centrifūgas kolonnu un pievieno 100 µl destilēta ūdens. Inkubē 5 minūtes istabas temperatūrā un centrifugē pie 10 000 rpm 1 min.
10. Kontrolē ekstrakcijas kvalitāti un iedarbīgumu (piemēram, izmērot OB (260 nm) ar spektrofotometru vai veicot elektroforēzi agarozes gelā).
11. Atšķaida paraugus tā, lai beigās DNS koncentrācija būtu 50–100 ng/µl.
12. DNS šķīdumus uzglabā 4 °C, līdz ir veiktas PCR analīzes.

DNS ekstrakcijai var izmantot citu firmu ražotos testēšanas komplektus, ja ir pierādīts, ka ar tiem ir iegūti līdzīgi rezultāti.

4.2. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)

4.2.1. Reaktīvi

- 10 X buferis (ir komplektā ar *Taq* DNS polimerāzi)
- $MgCl_2$ (ir komplektā ar DNS polimerāzi) (25 mM)
- *Taq* DNS polimerāze (*Goldstar, Eurogentec*) 5 U/ μ l
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) *Master Mix* (20 mM) pirms lietošanas jāatšķaida 10 reizes (pie 2 mM)
- d H_2O (destilēts H_2O bez DNS un RNS)

4.2.2. Praimeri

Jālieto šādi praimeri ⁽¹⁾:

CF (10 μ M)

CR (10 μ M)

4.2.3. PCR maisījums

PCR maisījums katrā stobriņā ir:

	Tilpums stobriņā	Beigu koncentrācija
Buferis (10 X)	5 μ l	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 μ l	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 μ l	0,2 mM
CF (10 μ M)	1 μ l	0,2 μ M
CR (10 μ M)	1 μ l	0,2 μ M
<i>Taq</i> polimerāze (5 U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
d H_2O	31,5 μ l	

— 49 μ l šā PCR maisījuma sadala pa PCR stobriņiem.

— Katrā stobriņā pievieno 1 μ l izdalītā DNS (50–100 ng/ μ l).

4.2.4. Kontroles

Veic divu veidu kontroles.

— Negatīvās kontroles sastāv no d H_2O (1 μ l uz 49 μ l PCR maisījuma). To mērķis ir atklāt iespējamu darba vides reaktīvu kontamināciju. Uz katrām 10 paraugiem vai pēc katras paraugu partijas jāveic viena negatīvā kontrole.

⁽¹⁾ Šos praimerus vai to aprakstus var iegūt Kopianas references laboratorijā saistībā ar gliemeņu slimībām (*LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francija*).

- Pozitīvās kontroles sastāv no plazmīdas DNS, kas satur OsHV-1 genoma mērķa rajonu CF-CR. To mērķis ir pārbaudīt PCR reakcijas iedarbīgumu. Katrā PCR analizē jāiekļauj viena pozitīvā kontrole. Pozitīvās kontroles ir pieejamas Kopienas references laboratorijā.

4.2.5. Amplifikācija

Amplifikācijas ciklus veic DNS amplifikatorā.

- Sākotnējā denaturēšana: 94 °C, 2 min.
- Amplifikācija: 35 cikli (94 °C, 1 min., 50 °C, 1 min. un 72 °C, 1 min.).
- Beigu elungācija: 5 min. 72 °C.

4.3 Elektroforēze

4.3.1 Reaktīvi

- 50 X TAE (nopērkams jau gatavs lietošanai):

Tris bāze (40 mM) 242 g

Ledus etiķskābe (40 mM) 57,1 ml

Na₂EDTA.2H₂O (1 mM) 18,61 g

dH₂O uz 1 litru

Noregulē pH līmeni līdz 8.

- Agarozes gels 2,5 % 1X TAE buferī.

Etiķa bromīdu (0,5 µg/ml) pievieno pēc gela atdzesēšanas.

- *Loading blue dye* buferis:

bromofenolzilais 0,25 %

ksilēncianols FF 0,25 %

saharoze 40 %

Glabā 4 °C.

Lieto atšķaidītu 6 reizes (2 µl *loading blue* bufera uz 10 µl PCR produktu).

- Molekulārā svara marķieris:

SmartLadder SF (Eurogentec) – lietošanai gatavs molekulārā svara marķieris, ieskaitot 9 joslas ar vienmērīgām atstarpēm garumā no 100 līdz 1 000 bp.

4.3.2 Agarozes gela sagatavošana

1. Nosver 2,5 g agarozes, pievieno 100 ml 1X TAE bufera un karsē, līdz maisījums ir izkūsis.

2. Pēc šķīduma atdzesēšanas, pievieno etīdija bromīdu (5 µl uz 100 ml agarozes gela) un šķīdumu ielej īpašā formā, kurā ir ķemmes (lai veidotu bedrītes).
3. Kad gels ir polimerizējies, izņem ķemmes un ievieto gelu horizontālā elektroforēzes sistēmā, kurā ir tik daudz 1X TAE bufera, lai tas pārklātu agarozes gelu.
4. 10 µl PCR produktu samaisa ar 2 µl zilās krāsvielas (6X) un ielej bedrītēs.
5. Vienu bedrīti atvēl molekulārā svara marķierim (5 µl).
6. Pieslēdz strāvu ar stiprumu 50 līdz 150 voltu un turpina elektroforēzi 30 min. līdz 1 stundai, atkarībā no gela daudzuma un biezuma.
7. Skatās gelu UV gaismā.

4.4. Interpretācija

Par OsHV-1 µVar klātbūtni paraugā liecina attiecīgā garuma joslas klātbūtne (157 bp, nevis 173 bp OsHV-1 gadījumā) 2,5 % agarozes gelā, kur visas negatīvās kontroles ir negatīvas un visas pozitīvās kontroles – pozitīvas.

C DAĻA

Robežzonas definēšana

Definējot robežzonu saskaņā ar 2. panta 2. punktu, ņem vērā šādus faktorus, ieskaitot faktorus, kuri ietekmē slimības izplatīšanās risku:

- a) gliemeņu skaitu, procentuālo daļu un izvietojumu inficētajā audzētavā vai gliemju audzēšanas zonā;
- b) attālumu līdz kaimiņu audzētavām vai gliemju audzēšanas zonām un to blīvumu;
- c) to, cik tuvu atrodas pārstrādes uzņēmumi, kontaktaudzētavas vai gliemju audzēšanas kontaktzonas;
- d) audzētavās vai gliemju audzēšanas zonās pārstāvētās sugas;
- e) izmantotās audzēšanas metodes slimības skartajās audzētavās vai gliemju audzēšanas zonās un blakus esošajās audzētavās vai gliemju audzēšanas zonās; un
- f) hidrodinamiskos apstākļus un citus epizootioloģiskā ziņā svarīgus konstatētos faktorus.

II PIELIKUMS

Dzīvnieku veselības sertifikāta paraugs tādu *Crassostrea gigas* austeru laišanai tirgū, kuras ir paredzētas nosūtīšanai uz audzēšanas un izklāšanas zonām

EIROPAS SAVIENĪBA

Iekšējās tirdzniecības sertifikāts

I daļa. Informācija par kravu	I.1. Nosūtītājs Nosaukums Adrese Pasta indekss		I.2. Sertifikāta references numurs		I.2.a. Vietējais references numurs			
			I.3. Centrālā kompetentā iestāde					
			I.4. Centrālā kompetentā iestāde					
	I.5. Saņēmējs Nosaukums Adrese Pasta indekss		I.6.					
			I.7.					
	I.8. Izcelsmes valsts		ISO kods	I.9.		I.10. Saņēmējvalsts	ISO kods	I.11.
	I.12. Izcelsmes vieta/leguves vieta Atzīta akvakultūras audzētava <input type="checkbox"/> Citi <input type="checkbox"/> Nosaukums Adrese Pasta indekss		Atzīšanas numurs		I.13. Saņemšanas vieta Atzīta akvakultūras audzētava <input type="checkbox"/> Citi <input type="checkbox"/> Nosaukums Adrese Pasta indekss		Atzīšanas numurs	
	I.14. Iekraušanas vieta Pasta indekss		I.15. Izbraukšanas datums un laiks					
	I.16. Transporta veids Lidmašīna <input type="checkbox"/> Kuģis <input type="checkbox"/> Vilciena vagoni <input type="checkbox"/> Automašīna <input type="checkbox"/> Citi <input type="checkbox"/> Identifikācija:		I.17. Transportētājs Nosaukums Adrese Pasta indekss				Atzīšanas numurs Dalībvalsts	
	I.18. Dzīvnieka suga/Produkts		I.19. Preces kods (KN kods) 03.07		I.20. Numurs/Daudzums			
	I.21.		I.22. Iepakojumu skaits					
	I.23. Konteinera identifikācija/Plombes numurs		I.24. Iepakojuma veids					
	I.25. Dzīvnieki sertificēti kā/Produktu sertificēšanas nolūks Audzēšanai <input type="checkbox"/> Darba zirgi <input type="checkbox"/>							
	I.26. Tranzīts caur trešo valsti <input type="checkbox"/> Trešā valsts Izbraukšanas punkts Iebraukšanas punkts		ISO kods Kods RKP vienības numurs:	I.27. Tranzīts caur dalībvalstīm <input type="checkbox"/> Dalībvalsts Dalībvalsts Dalībvalsts		ISO kods ISO kods ISO kods		
I.28. Eksports <input type="checkbox"/> Trešā valsts Izbraukšanas punkts		ISO kods Kods	I.29.					
I.30.								
I.31. Dzīvnieku identifikācija Suga (Zinātniskais nosaukums)		Skaits						

EIROPAS SAVIENĪBA

Tādu *Crassostrea gigas* austeru laišanai tirgū, kuras ir paredzētas nosūtīšanai uz audzēšanas un izklāšanas zonām

II. Informācija par veselību	II.a. Sertifikāta uzskaites numurs	II.b.
<p>(¹)(²)[II.1. Prasības attiecībā uz <i>Crassostrea gigas</i> austerēm, kuras ir no robežzonas, kas izveidota saskaņā ar 2. pantu Regulā (ES) Nr. 175/2010</p> <p>Es, apakšā parakstījis valsts pilnvarots inspektors, apliecinu, ka šā sertifikāta I daļā aprakstītās <i>Crassostrea gigas</i> austeres:</p> <p>II.1.1. ir no zonas, kurā piemēro slimības kontroles pasākumus saistībā ar <i>Crassostrea gigas</i> austeru paaugstinātu mirstību OsHV-1 μvar vīrusa dēļ;</p> <p>(¹)[II.1.2. drīkst laist tirgū saskaņā ar 3. panta 2. punkta a) apakšpunktu Regulā (ES) Nr. 175/2010;]</p> <p>(¹)[II.1.2. ir no robežzonas daļas, kuru nav skārusi <i>Crassostrea gigas</i> austeru paaugstināta mirstība, un sūtījumam ir ņemti paraugi un veikti testi saskaņā ar I pielikumu Regulai (ES) Nr. 175/2010, un rezultāts bijis negatīvs;]</p> <p>(¹)(³)[II.2. Prasības attiecībā uz <i>Crassostrea gigas</i> austerēm, kuras ir no dalībvalsts vai iecirkņa, kur iepriekš piemēroti ierobežošanas pasākumi saistībā ar <i>Crassostrea gigas</i> austeru paaugstinātu mirstību OsHV-1 μvar dēļ, un kuras ir paredzētas nosūtīšanai uz dalībvalstīm vai iecirkņiem, kur piemēro programmu OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai</p> <p>Es, apakšā parakstījis valsts pilnvarots inspektors, apliecinu, ka šā sertifikāta I daļā aprakstītās <i>Crassostrea gigas</i> austeres:</p> <p>II.2.1. ir no audzētavas vai gliemju audzēšanas zonas, kurā saskaņā ar audzētavas vai gliemju audzēšanas zonas uzskaites datiem nav vērojamas paaugstinātas mirstības pazīmes;</p> <p>II.2.2. ir no iecirkņa, kur, ņemot paraugus un veicot testus saskaņā ar I pielikumu Regulā (ES) Nr. 175/2010, ir pierādīts, ka šajā iecirknī <i>Crassostrea gigas</i> austerēm nav OsHV-1 μvar.]</p>		
<p>II.3. Pārvadāšanas un marķēšanas prasības</p> <p>Es, apakšā parakstījis valsts pilnvarots inspektors, apliecinu, ka:</p> <p>II.3.1. šā sertifikāta I daļā norādītās <i>Crassostrea gigas</i> austeres ir ievietotas tādos apstākļos, ieskaitot ūdens kvalitāti, kas nemaina to veselības stāvokli;</p> <p>II.3.2. pārvadāšanas konteiners pirms iekraušanas ir bijis tīrs un ir dezinficēts vai iepriekš nav izmantots;</p> <p>II.3.3. sūtījums ir apzīmēts ar skaidri salasāmu marķējumu uz konteina ārējās sienas vai, ja transportam izmanto kuteri ar iebūvētu baseinu, tad marķējums ir norādīts kravas sarakstā līdz ar attiecīgo informāciju, kas minēta šā sertifikāta I daļas I.8. līdz I.13. ailē, kā arī šādu paziņojumu:</p> <p>vai nu (¹)[“<i>Crassostrea gigas</i> austeres paredzētas audzēšanai/izklāšanai zonā, kur piemēro programmu OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai”]</p> <p>vai (¹)[“<i>Crassostrea gigas</i> austeres paredzētas audzēšanai/izklāšanai zonā, kur piemēro slimības kontroles pasākumus, un tās ir no zonas, kur piemēro slimības kontroles pasākumus”].</p>		
<p>Piezīmes</p>		
<p>I daļa</p>		
<p>— I.12. aile: attiecīgā gadījumā lietojiet konkrētās audzētavas vai gliemju audzēšanas zonas atļaujas numuru.</p>		
<p>— I.13. aile: attiecīgā gadījumā lietojiet konkrētās audzētavas vai gliemju audzēšanas zonas atļaujas numuru.</p>		
<p>— I.20. un I.31. aile: kā daudzumu norādiet kopskaitu.</p>		
<p>— I.25. aile: ja paredzētas audzēšanai, atzīmējiet “Audzēšana”, ja paredzētas izklāšanai, atzīmējiet “Izklāšana”.</p>		

EIROPAS SAVIENĪBA

Tādu *Crassostrea gigas* austeru laišanai tirgū, kuras ir paredzētas nosūtīšanai uz audzēšanas un izklāšanas zonām

II. Informācija par veselību	II.a. Sertifikāta uzskaites numurs	II.b.
<p>II daļa</p> <p>(¹) Atstājiet atbilstošo variantu.</p> <p>(²) Šā sertifikāta II.1. daļa attiecas uz tādu <i>Crassostrea gigas</i> austeru sūtījumiem, kuri ir no robežzonas, kas izveidota saskaņā ar 2. panta 2. punktu Regulā (ES) Nr. 175/2010, un kurus saskaņā ar minētās regulas 3. panta 2. punkta a) vai b) apakšpunktu drīkst izvest ārpus minētās zonas.</p> <p>(³) Šā sertifikāta II.2. daļa attiecas uz tādu <i>Crassostrea gigas</i> austeru sūtījumiem, kuras ir minēti 5. panta 1. punktā Regulā (ES) Nr. 175/2010 un ir paredzētas nosūtīšanai uz dalībvalstīm vai iecirkņiem, kur piemēro programmu OsHV-1 μvar agrīnai konstatēšanai, un kuras ir no zonas, kur iepriekš piemēroti ierobežošanas pasākumi saistībā ar <i>Crassostrea gigas</i> austeru paaugstinātu mirstību.</p>		
<p>Valsts pilnvarots veterinārārsts vai valsts pilnvarots inspektors</p> <p>Vārds, uzvārds (drukātiem burtiem):</p> <p>Vietējā veterinārā nodaļa (VVN):</p> <p>Datums:</p> <p>Zīmogs:</p> <p>Kvalifikācija un amats:</p> <p>VVN Nr.:</p> <p>Paraksts:</p>		