

# COMMISSIONE

## DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 4 luglio 2000

**che stabilisce procedure diagnostiche, metodi per il prelievo di campioni e criteri per la valutazione dei risultati degli esami di laboratorio ai fini della conferma e della diagnosi differenziale della malattia vescicolare dei suini**

[notificata con il numero C(2000) 1805]

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2000/428/CE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

mente la malattia vescicolare dei suini e distinguerla dall'afte epizootica.

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

(4) I risultati dei più recenti test comparativi eseguiti a livello comunitario dimostrano, in particolare, la validità delle prove messe a punto per rivelare l'antigene o il genoma del virus della malattia vescicolare dei suini, a complemento della diagnosi virologica mediante isolamento del virus.

vista la direttiva 92/119/CEE del Consiglio, del 17 dicembre 1992, che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie degli animali nonché misure specifiche per la malattia vescicolare dei suini<sup>(1)</sup>, modificata da ultimo dall'atto di adesione di Austria, Finlandia e Svezia, in particolare il paragrafo 3 dell'allegato II,

(5) L'esperienza acquisita negli ultimi anni in fatto di lotta contro la malattia vescicolare dei suini ha permesso di definire i procedimenti più adatti per il prelievo dei campioni e i criteri per la valutazione dei risultati degli esami di laboratorio ai fini di una diagnosi corretta della malattia in circostanze diverse.

considerando quanto segue:

(1) È necessario determinare a livello comunitario procedure diagnostiche, metodi per il prelievo di campioni e criteri per la valutazione dei risultati degli esami di laboratorio che permettano di confermare la malattia vescicolare dei suini e di distinguerla rapidamente dall'afte epizootica, ai fini di una lotta efficace contro entrambe queste malattie.

(6) È stato tenuto conto del parere e delle raccomandazioni del comitato scientifico per la salute e il benessere degli animali relativamente alla malattia vescicolare dei suini.

(7) Le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

(2) L'allegato III della direttiva 92/119/CEE precisa le funzioni e i compiti del laboratorio comunitario di riferimento per la malattia vescicolare dei suini, il quale coordina, in consultazione con la Commissione, i metodi impiegati dagli Stati membri per la diagnosi di questa malattia. Tra i compiti affidati a questo laboratorio figura l'organizzazione periodica di test comparativi e la fornitura di reagenti normalizzati a livello comunitario.

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

### Articolo 1

(3) Grazie ai recenti progressi compiuti nel campo delle tecniche di laboratorio, è possibile diagnosticare rapida-

1. Gli Stati membri provvedono affinché la conferma della malattia vescicolare dei suini e la diagnosi differenziale rispetto all'afte epizootica siano basate su:

a) il rilevamento dei segni clinici della malattia;

<sup>(1)</sup> GU L 62 del 15.3.1993, pag. 69.

- b) l'individuazione del virus, dell'antigene o del genoma in campioni di tessuto epiteliale, liquido vescicolare o feci;
- c) la rivelazione di una reazione di un anticorpo specifico in campioni di siero,

conformemente alle procedure, ai metodi per il prelievo di campioni e ai criteri per la valutazione dei risultati degli esami di laboratorio descritti nel manuale allegato alla presente decisione.

2. Tuttavia, i laboratori diagnostici nazionali citati nell'allegato II, paragrafo 5, della direttiva 92/119/CEE possono modificare i test indicati nel manuale allegato alla presente decisione oppure applicare test diversi, a condizione che questi dimostrino di avere sensibilità e specificità equivalenti.

La sensibilità e la specificità di questi test modificati o alternativi devono essere valutate nel corso dei periodici test compara-

tivi organizzati dal laboratorio comunitario di riferimento per la malattia vescicolare dei suini.

*Articolo 2*

La presente decisione si applica a decorrere dal 1° ottobre 2000.

*Articolo 3*

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 4 luglio 2000.

*Per la Commissione*

David BYRNE

*Membro della Commissione*

---

## ALLEGATO

**MANUALE DI PROCEDURE DIAGNOSTICHE, METODI PER IL PRELIEVO DI CAMPIONI E CRITERI PER LA VALUTAZIONE DEI RISULTATI DEGLI ESAMI DI LABORATORIO AI FINI DELLA CONFERMA E DELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEI SUINI**

## CAPITOLO I

***Introduzione, obiettivi e definizioni***

1. Il presente manuale:
  - a) stabilisce orientamenti e requisiti minimi in materia di procedure diagnostiche, metodi per il prelievo di campioni e criteri per la valutazione dei risultati degli esami di laboratorio ai fini di una corretta diagnosi della malattia vescicolare dei suini. Viene tuttavia rivolta particolare attenzione anche alla diagnosi differenziale rispetto all'afta epizootica;
  - b) recepisce le disposizioni dell'allegato II della direttiva 92/119/CEE, in particolare i paragrafi 4, 7 e 8 di detto allegato;
  - c) è destinato prevalentemente alle autorità competenti per la lotta contro la malattia vescicolare dei suini, ragione per cui esso non contiene descrizioni particolareggiate delle tecniche di laboratorio, ma insiste soprattutto sui principi e le applicazioni dei test e sulla valutazione dei relativi risultati.
2. Ai fini del presente manuale si applicano le seguenti definizioni:
  - a) «suino sieropositivo»: qualunque suino il cui siero ha un titolo di anticorpi uguale o superiore al siero di riferimento della malattia vescicolare dei suini n. 4 (cfr. capitolo X) nella prova di neutralizzazione del virus praticata dal laboratorio nazionale;
  - b) «soggetto reattivo singolo» o «falso positivo»: qualunque suino rivelatosi sieropositivo all'esame sierologico per l'accertamento della malattia vescicolare dei suini, ma che rappresenta l'unico caso positivo dell'allevamento di appartenenza e non è mai stato a contatto con il virus della malattia né risulta aver infettato gli altri suini venuti a contatto con lui. Perché un animale sieropositivo si confermi come falso positivo, si devono verificare le condizioni enunciate al capitolo VIII C;
  - c) «suini in contatto»: i suini che sono — o sono stati nel corso dei precedenti 28 giorni — a contatto immediato con uno o più soggetti sieropositivi o con animali sospetti. Può trattarsi di animali che si trovano o sono rimasti per un certo tempo nello stesso recinto o in recinti adiacenti, qualora sia possibile il contatto diretto tra gli animali da un recinto all'altro.

## CAPITOLO II

***Orientamenti per le ispezioni sui suini che presentano segni clinici della malattia vescicolare dei suini***

1. In caso di sospetta presenza del virus della malattia vescicolare dei suini in un'azienda, gli Stati membri provvedono affinché il veterinario ufficiale ispezioni al più presto possibile un numero statisticamente rilevante di capi per individuare i segni clinici descritti al capitolo IX.
2. Qualora vengano rilevati segni clinici di malattia vescicolare dei suini o di afta epizootica, gli Stati membri provvedono affinché venga eseguita al più presto possibile una diagnosi differenziale mediante campionamento ed opportune ricerche in laboratorio, secondo quanto disposto ai capitoli IV, VII e VIII del presente manuale.

## CAPITOLO III

***Procedure generali per il prelievo e il trasporto dei campioni***

1. Chiunque entri o esca da un'azienda suinicola in cui si sospetti la presenza della malattia vescicolare dei suini deve osservare le più rigorose norme igieniche per evitare la contaminazione o la propagazione del virus.
2. Tutti i suini da cui vengono prelevati campioni devono essere marchiati singolarmente in modo da poter essere identificati per un eventuale nuovo campionamento. Si raccomanda di annotare l'ubicazione di ciascun animale sottoposto a campionamento nonché il relativo contrassegno, particolarmente nel caso di animali sospetti.
3. I campioni sono inviati al laboratorio unitamente ad appositi formulari, nei quali sono indicati i precedenti dell'animale e gli eventuali segni clinici osservati.
4. Poiché la presenza di qualsiasi tipo di vescicola nei suini può essere indice di afta epizootica, si prenderanno particolari precauzioni per trasportare i campioni sospetti in un imballaggio sicuro. Tali precauzioni sono intese soprattutto a prevenire la rottura del recipiente o la fuoriuscita del materiale e il conseguente rischio di contaminazione, ma anche a garantire che il campione arrivi in buono stato. Se il campione viene conservato nel ghiaccio, si baderà ad impedire la fuoriuscita di acqua dal contenitore. I recipienti con il materiale sospetto non devono essere aperti dopo aver lasciato la zona infetta fino al loro arrivo in laboratorio.

5. I campioni che si sospettano infetti da malattia vescicolare dei suini devono essere analizzati esclusivamente presso un laboratorio autorizzato a manipolare il virus dell'afta epizootica a fini diagnostici, conformemente alla normativa comunitaria sulla lotta contro l'afta epizootica, tranne qualora quest'ultima malattia sia già stata esclusa.
6. Tutti i campioni possono essere trasportati ad una temperatura di 4 °C se la durata prevista del trasporto è inferiore a 48 ore, altrimenti devono essere conservati ad una temperatura non superiore a -20 °C.
7. Per i campioni diretti al laboratorio comunitario di riferimento in provenienza da Stati membri diversi dal Regno Unito, l'unico mezzo di trasporto autorizzato è l'aereo a destinazione di Londra-Heathrow o di Londra-Gatwick. Prima della spedizione devono essere comunicati al laboratorio, per fax [(44) 14 83-23 26 21] o per posta elettronica, gli estremi del volo, la data, l'ora presunta di arrivo e il numero della lettera di trasporto aereo, per consentire il rapido reperimento del pacco all'arrivo. Quest'ultimo dev'essere indirizzato a:

«Institute for Animal Health  
Pirbright Laboratory Community Reference Laboratory for swine vesicular disease  
Ash Road, Pirbright, Woking  
Surrey GU24 0NF  
England, UK»

L'etichetta dovrà inoltre recare la seguente dicitura: «Animal Pathological Material of no commercial value. Perishable. Fragile. To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory» («Materiale patogeno di origine animale. Senza alcun valore commerciale. Deperibile. Fragile. Sarà ritirato all'aeroporto dal destinatario. Può essere aperto soltanto all'interno del laboratorio»).

I pacchi possono essere ritirati all'aeroporto unicamente da personale autorizzato del laboratorio comunitario di riferimento, munito di apposita licenza d'importazione rilasciata dal ministero britannico dell'agricoltura, alimentazione e pesca. Si tratta di un'autorizzazione permanente e non è necessario un documento distinto per ogni importazione. Nel Regno Unito è vietato il trasporto a mano di materiale sospetto di malattia vescicolare da parte di personale non autorizzato. È vietato altresì il ricorso a spedizionieri.

8. Il trasporto di campioni ai laboratori nazionali deve ottemperare alle istruzioni emanate dalle autorità competenti degli Stati membri.

#### CAPITOLO IV

##### *Procedure di campionamento nelle aziende con casi sospetti*

1. Se in un'azienda si sospetta la presenza del virus della malattia vescicolare dei suini in seguito all'osservazione di segni clinici della malattia, si procede al prelievo di campioni da gruppi rappresentativi di suini che presentano tali segni, per confermare la malattia ed effettuare una diagnosi differenziale rispetto all'afta epizootica.
2. In questo caso, i tessuti da preferire per la diagnosi sono l'epitelio e il liquido vescicolare di vescicole non rotte o rotte di recente, prelevati da suini che presentano i segni tipici della malattia, nei quali siano individuabili il virus della malattia vescicolare dei suini, i suoi antigeni o il relativo genoma. Si raccomanda di effettuare campionamenti su cinque o sei animali.
3. Anche se sono disponibili tessuto epiteliale fresco e liquido vescicolare in quantità sufficiente (1g o più), è necessario raccogliere anche i seguenti campioni:
  - a) sangue di animali sospetti e di animali che sono stati a contatto con questi per le prove sierologiche; e
  - b) feci di suini sospetti ed escrementi raccolti dal pavimento del loro recinto e di recinti adiacenti, per le prove virologiche.
4. Per la raccolta e il trasporto dei campioni si procederà nel modo seguente:
  - a) epitelio e liquido vescicolare:
    - prelevare, se possibile, almeno 1g di tessuto epiteliale da una vescicola non rotta o rotta di recente. Si raccomanda di somministrare agli animali un sedativo prima di procedere al prelievo, per evitare lesioni al personale e per il benessere degli animali stessi,
    - se i campioni di epitelio vengono trasportati immediatamente al laboratorio nazionale (in meno di 3 ore), essi possono essere tenuti a secco e al fresco; se, invece, si prevede che impiegheranno più di tre ore per arrivare al laboratorio, devono essere sistemati in un terreno di trasporto costituito da quantitativi equivalenti di glicerolo e di tampone fosfato 0,04 M o altro tampone equivalente (ad esempio HEPES), in modo che il pH venga mantenuto entro i limiti ottimali per la sopravvivenza del virus dell'afta epizootica (cioè da 7,2 a 7,6). Il terreno di trasporto dovrebbe contenere antibiotici per potenziare l'attività antimicrobica. Gli antibiotici più indicati e le rispettive concentrazioni (per ml finale) sono:
      - i) penicillina 1 000 UI;
      - ii) neomicina solfato 100 UI;
      - iii) polymyxin B solfato 50 UI;
      - iv) mycostatin 100 UI;
    - se viene prelevato del liquido vescicolare da una vescicola non rotta, esso va conservato in un recipiente diverso e non dev'essere diluito;

- b) campioni ematici:
- i campioni di sangue possono servire per le prove sierologiche o virologiche. Tuttavia, in genere vengono prelevati unicamente da suini presumibilmente guariti da un'infezione clinica o subclinica, ai fini del rilevamento degli anticorpi, mentre per l'individuazione del virus sono più adatti i campioni di epitelio, liquido vescicolare e feci provenienti da animali che manifestano i segni clinici della malattia. Si raccomanda di prelevare campioni interi di sangue e di metterli in contenitori sotto vuoto, privi di anticoagulante; i quali saranno trasportati chiusi;
- c) campioni fecali:
- i campioni di feci raccolti dal pavimento del locale che ospita o che ha ospitato suini sospetti di aver contratto la malattia vescicolare, nonché gli strisci fecali provenienti da suini vivi sospetti, vanno sistemati in contenitori solidi, a tenuta stagna.

I recipienti contenenti campioni sospetti devono essere disinfettati esteriormente prima di essere trasportati in laboratorio. Si consiglia l'uso di uno dei seguenti disinfettanti:

- idrossido di sodio (diluito a 1:100),
- formalina (soluzione di formalina diluita a 1:9, contenente almeno il 34 % di formaldeide),
- ipoclorito di sodio (2 % di cloro).

Questi disinfettanti vanno manipolati con cautela.

## CAPITOLO V

### ***Procedure di campionamento per la sorveglianza sierologica della malattia vescicolare dei suini***

1. Qualora vengano effettuate prove sierologiche a fini di:
  - a) Sorveglianza presso allevamenti in cui la presenza della malattia non è né provata né sospetta;
  - b) Sorveglianza presso macelli, mercati, centri di raccolta e simili, nel quadro di normali operazioni di campionamento;
  - c) Sorveglianza indiscriminata di suini provenienti da altri Stati membri presso l'azienda importatrice,i campioni ematici devono essere prelevati conformemente alle disposizioni dei corrispondenti programmi di sorveglianza o di eradicazione approvati a norma della decisione 90/424/CEE del Consiglio <sup>(1)</sup> o della direttiva 90/425/CEE del Consiglio <sup>(2)</sup>, oppure, in mancanza di simili disposizioni, conformemente alle procedure stabilite dalle autorità competenti degli Stati membri.
2. Qualora vengano effettuate prove sierologiche a fini di:
  - a) sorveglianza presso aziende situate in una zona di protezione o di sorveglianza istituita in seguito alla conferma di focolai della malattia a norma dell'allegato II, paragrafi 7 e 8, della direttiva 92/119/CEE; oppure
  - b) sorveglianza presso le aziende di cui all'articolo 9 della direttiva 92/119/CEE,i campioni ematici devono essere prelevati secondo le modalità seguenti:
  - nelle aziende da allevamento si procederà ad un campionamento casuale che permetta di rilevare un'incidenza del 5 % di sieroconversione con un'affidabilità del 95 %,
  - nelle aziende esclusivamente da ingrasso, la selezione dovrà essere condotta in modo tale che il numero complessivo di campioni raccolti non sia inferiore al numero sufficiente a rivelare un'incidenza del 5 % con un'affidabilità del 95 %. In ogni caso, i campioni devono essere prelevati dal maggior numero possibile di recinti selezionati a caso,
  - nelle aziende miste da allevamento e da ingrasso, i campioni saranno prelevati da ciascun gruppo di suini alloggiato in impianti diversi, in modo che il campionamento riveli un'incidenza del 5 % di sieroconversione con un'affidabilità del 95 %.

## CAPITOLO VI

### ***Ulteriori azioni e nuovo prelievo di campioni in presenza di animali sieropositivi***

1. Qualora, nel quadro della sorveglianza menzionata al capitolo V, paragrafo 1 lettera a) o paragrafo 2, venga individuato in un'azienda un solo suino sieropositivo, l'autorità competente dispone che:
  - a) siano applicate in quell'azienda le misure previste all'articolo 4 della direttiva 92/119/CEE del Consiglio, se non vi si è già provveduto;
  - b) sia condotta un'ispezione nell'azienda, secondo quanto disposto al capitolo II, paragrafo 1;

<sup>(1)</sup> GU L 224 del 18.8.1990, pag. 19.

<sup>(2)</sup> GU L 224 del 18.8.1990, pag. 29.

- c) vengano prelevati, a fini di analisi sierologica, campioni ematici:
- dall'animale sospetto,
  - dai suini in contatto, alloggiati nello stesso recinto dell'animale sospetto o in recinti adiacenti; il campionamento di questi animali deve essere effettuato in modo da rivelare un'incidenza del 50 % di sieroconversione con un'affidabilità del 95 % per recinto.
2. Nondimeno, l'autorità competente può decidere la sospensione delle misure di cui al punto 1, lettera a) nel caso in cui:
- a) dall'indagine epidemiologica effettuata a norma dell'articolo 8 della direttiva 92/119/CEE non risulti che la malattia vescicolare dei suini è stata introdotta nell'azienda;
- b) non siano stati riscontrati segni clinici della malattia; e
- c) l'azienda non sia situata in una zona di protezione o di sorveglianza istituita in seguito all'insorgenza confermata di focolai della malattia o in una zona soggetta ad altre restrizioni a causa di un focolaio confermato della malattia, e a condizione che:
- nessun suino esca dall'azienda a fini di scambi intracomunitari; e
  - i suini dell'azienda in questione vengano condotti unicamente al macello per l'abbattimento immediato o in un'altra azienda dalla quale non esca alcun suino a fini di scambi intracomunitari,
- finché i risultati dei successivi controlli e delle prove sierologiche non abbiano escluso definitivamente la presenza della malattia vescicolare dei suini.
3. Se le ispezioni e le prove sierologiche di cui al precedente paragrafo 1, lettere b) e c):
- a) danno risultati negativi o confermano soltanto il primo e unico caso positivo come soggetto reattivo singolo, la malattia vescicolare dei suini può essere esclusa. Le misure di cui al paragrafo 1 lettera a), sono quindi revocate, a meno che l'azienda non si trovi in una zona di protezione o di sorveglianza delimitata intorno ad un focolaio della malattia, nella quale rimangono in vigore misure di eradicazione ai sensi dell'allegato II, paragrafi 7 o 8, della direttiva 92/119/CEE;
- b) rivelano la presenza di più d'un soggetto sieropositivo nell'azienda, la malattia vescicolare dei suini dev'essere confermata, oppure, se non sussistono le condizioni per la conferma specificate al paragrafo 4 dell'allegato II della direttiva 92/119/CEE, si deve procedere ad un nuovo prelievo di campioni secondo le modalità indicate al punto 4.
4. Qualora in un'azienda siano stati individuati più suini sieropositivi in esito al campionamento e alle prove sierologiche di cui al capitolo V, paragrafo 1, lettere a) e c) o paragrafo 2, senza che sussistano le condizioni necessarie per la conferma della malattia vescicolare dei suini di cui all'allegato II, paragrafo 4, della direttiva 92/119/CEE, l'autorità competente dispone che:
- a) Siano applicate o rimangano in applicazione le disposizioni dell'articolo 4 della direttiva 92/119/CEE;
- b) Sia condotta un'ispezione nell'azienda secondo quanto disposto al capitolo II, paragrafo 1;
- c) Vengano nuovamente prelevati, a fini di analisi sierologica, campioni ematici dai suini sieropositivi e da quelli in contatto, secondo quanto disposto al punto 1, lettera c);
- d) Vengano prelevati, a fini di analisi sierologica, campioni ematici dai suini alloggiati negli altri fabbricati dell'azienda, secondo le modalità indicate al capitolo V, paragrafo 2;
- e) Vengano prelevati, in numero sufficiente, campioni fecali da sottoporre ad esame virologico:
- dai suini sieropositivi,
  - dal pavimento dei recinti che ospitano animali sieropositivi e dei recinti adiacenti,
  - da recinti, scelti a caso, di altri fabbricati dell'azienda.

I campioni fecali di cui al primo e secondo trattino devono essere esaminati al più presto possibile. I campioni fecali di cui al terzo trattino saranno esaminati soltanto qualora i primi due siano risultati negativi, ma le prove sierologiche lascino supporre che il virus potrebbe essersi diffuso ad altri fabbricati aziendali.

Se, in seguito a queste prove e verifiche complementari, le condizioni richieste per la conferma della malattia vescicolare dei suini ai sensi dell'allegato II, paragrafo 4, della direttiva 92/119/CEE non sono ancora soddisfatte, i suini sieropositivi devono essere abbattuti o macellati secondo quanto prescritto all'allegato II, paragrafo 4, lettera d), della direttiva 92/119/CEE. Tuttavia, se altri suini risultano sieropositivi oltre a quelli già individuati con i precedenti campionamenti, si applicano ancora una volta, mutatis mutandis, le disposizioni di cui alle precedenti lettere a), b), c), d) ed e).

5. Fatte salve le misure contemplate all'articolo 9 della direttiva 92/119/CEE, qualora, nell'ambito delle attività di sorveglianza di cui al capitolo V, paragrafo 1, lettere b) o c), vengano individuati uno o più suini sieropositivi, l'autorità competente dispone che:
- Ove ciò sia necessario e fattibile, vengano eseguite opportune verifiche complementari, eventualmente con prelievo di campioni, nel luogo stesso in cui sono stati reperiti gli animali sieropositivi e compatibilmente con le condizioni locali, al fine di confermare o escludere la malattia vescicolare dei suini;
  - Le disposizioni dell'articolo 4 della direttiva 92/119/CEE siano applicate nell'allevamento d'origine dei suini;
  - Sia condotta un'ispezione nell'allevamento d'origine, secondo quanto disposto al capitolo II, paragrafo 1; e
  - Vengano prelevati, a fini di analisi sierologica, campioni ematici dai suini appartenenti all'allevamento d'origine degli animali sieropositivi, secondo le modalità indicate al capitolo V, paragrafo 2.
6. Nondimeno, l'autorità competente può decidere la sospensione delle misure di cui al punto 5, lettera b) nel caso in cui:
- dall'indagine epidemiologica effettuata a norma degli articoli 4 e 8 della direttiva 92/119/CEE non risulti che la malattia vescicolare dei suini è stata introdotta nell'azienda;
  - non siano stati riscontrati segni clinici della malattia;
  - l'azienda non sia situata in una zona di protezione o di sorveglianza istituita in seguito all'insorgenza confermata di focolai della malattia o in una zona soggetta ad altre restrizioni a causa di un focolaio confermato della malattia, e a condizione che:
    - nessun suino esca dall'azienda a fini di scambi intracomunitari; e
    - i suini dell'azienda in questione vengano condotti unicamente al macello per l'abbattimento immediato o in un'altra azienda dalla quale non esca alcun suino a fini di scambi intracomunitari,
- finché i risultati delle indagini e delle prove sierologiche complementari condotte nel luogo in cui si trovavano i suini sieropositivi e nell'allevamento d'origine non abbiano escluso definitivamente la presenza della malattia vescicolare dei suini.

## CAPITOLO VII

### *Principi e applicazioni delle prove virologiche e valutazione dei risultati*

#### **A. Individuazione dell'antigene del virus**

- Il metodo ELISA indiretto «a sandwich» ha sostituito la prova di fissazione del complemento come procedimento preferito per l'accertamento dell'antigene virale della malattia vescicolare dei suini. Si tratta dello stesso test utilizzato per la diagnosi dell'afra epizootica. Occorre eseguire contemporaneamente le prove per entrambe le malattie, a meno che l'afra epizootica non sia già stata esclusa. Si raccomanda di eseguire le prove, in particolare, su campioni di epitelio o di liquido vescicolare di suini in fase d'infezione acuta, nei quali possono essere presenti con titolo elevato e reperibili in poche ore sia il virus dell'afra epizootica che quello della malattia vescicolare dei suini <sup>(3)</sup>.

Le doppie file delle piastre a pozzetti ELISA vengono ricoperte di antisiero di coniglio contro la malattia vescicolare dei suini e contro ciascuno dei sette sierotipi dell'afra epizootica. Questi sono i sieri di cattura. I campioni da esaminare in sospensione vengono inseriti in ciascuna fila, unitamente ad opportuni campioni di riferimento per il controllo. Nella fase successiva si aggiunge nelle rispettive file l'omologo siero rivelatore di cavia, seguito dall'aggiunta di siero di coniglio anticavia coniugato ad un enzima quale la perossidasi del rafano. Le piastre vengono lavate più volte tra una fase e l'altra per eliminare i reattivi liberi. La reazione è positiva se appare una colorazione in seguito all'aggiunta di cromogeno e substrato. In caso di reazioni fortemente positive, la colorazione risulta evidente a occhio nudo; i risultati possono comunque essere letti spettrofotometricamente, nel qual caso un valore di densità ottica superiore dello 0,1 al valore base indica una reazione positiva.

- Per l'individuazione dell'antigene della malattia vescicolare dei suini e per la diagnosi differenziale rispetto all'afra epizootica in campioni di epitelio, liquido vescicolare o coltura di tessuto infetto si può ricorrere a procedimenti ELISA alternativi a base di anticorpi monoclonali, utilizzando anticorpi monoclonali selezionati come anticorpo di cattura e anticorpi monoclonali coniugati alla perossidasi come anticorpo rivelatore.
- Il test ELISA a base di anticorpi monoclonali può essere impiegato per studiare la variazione antigenica tra ceppi del virus della malattia vescicolare dei suini. Gli antigeni virali sviluppati in coltura vengono catturati da un antisiero di coniglio iperimmune contro la malattia vescicolare dei suini adsorbito in fase solida. Si provoca quindi la reazione di gruppi idonei di anticorpi monoclonali e si confronta il legame tra gli anticorpi monoclonali e i ceppi ottenuti sul campo con il legame tra gli anticorpi monoclonali e i ceppi parentali. Un legame simile indica la presenza di epitopi comuni ai ceppi parentali e ai ceppi ottenuti sul campo.

<sup>(3)</sup> La prova ELISA ha esito positivo quando sono presenti nel campione almeno  $10^5$  TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Doses o dosi infettive del tessuto in coltura) di virus.

**B. Isolamento e sviluppo del virus**

1. Di regola, le sospensioni chiarificate di campioni di epitelio, liquido vescicolare o feci, di cui si sospetta che possano contenere il virus della malattia vescicolare dei suini, devono essere inoculate in colture cellulari sensibili. Se la quantità e la qualità di materiale prelevato dalle vescicole è insufficiente per eseguire immediatamente un test ELISA, sarà necessario far sviluppare il virus in coltura in modo da amplificare l'antigene virale.
2. Per isolare e far sviluppare il virus, una sospensione epiteliale chiarificata viene inoculata in strati monocellulari IB-RS-2. È necessario usare due diluizioni di sospensione epiteliale, una elevata (1/500) e una bassa (1/10) per evitare che l'interferone liberato interferisca con lo sviluppo del virus della malattia vescicolare dei suini. Per l'isolamento del virus vengono aggiunti soltanto antibiotici al terreno di mantenimento. Per la diagnosi differenziale rispetto al virus dell'afte epizootica, devono essere inoculate altresì cellule primarie di tiroide bovina o cellule renali di criceti neonati (BHK-21).
3. Se si sviluppa un effetto citopatico, il liquido surnatante dev'essere raccolto da colture positive quando l'effetto è completo e utilizzato nell'ELISA ai fini dell'identificazione del virus. Le colture negative devono essere inoculate su colture di tessuto fresche a 48 o 72 ore e questo passaggio alla cieca dev'essere esaminato fino a 72 ore più tardi. In assenza di effetto citopatico dopo un ulteriore passaggio alla cieca, il campione può essere dichiarato negativo relativamente alla presenza di virus vivo.
4. I campioni fecali in sospensione possono essere trattati come al punto 1. Poiché le feci contengono generalmente meno virus dell'epitelio, è indispensabile, in assenza di effetto citopatico nei primi due passaggi, effettuare un terzo passaggio alla cieca.
5. L'inoculazione simultanea di una stirpe cellulare suina e di uno dei succitati sistemi di coltura di tessuto (di preferenza cellule primarie di tiroide bovina) rappresenta un'utile indicazione per determinare se i campioni di vescicole contengono il virus della malattia vescicolare dei suini o quello dell'afte epizootica, dato che il primo si sviluppa soltanto in cellule di origine suina. Tuttavia, gli isolati di virus di afte epizootica risultanti da una serie prolungata di trasmissioni tra suini possono anche svilupparsi preferenzialmente in sistemi di colture cellulari suine.

**C. Rivelazione del genoma con la reazione a catena della polimerasi (PCR)**

1. Si può ricorrere ai metodi di riconoscimento dell'acido nucleico per evidenziare il genoma virale della malattia vescicolare dei suini in materiale clinico mediante la tecnica PCR e per stabilire rapporti tra isolati del virus della malattia vescicolare dei suini determinando la sequenza nucleotidica di parte del genoma. Le tecniche basate sulla PCR sono state messe a punto nell'intento di migliorare la sensibilità della diagnosi. Sono state descritte procedure leggermente diverse di PCR con trascrittasi inversa, che utilizzano iniziatori corrispondenti a zone particolarmente ben conservate dei geni 1C e 1D.
2. La tecnica PCR è rapida (i risultati sono generalmente disponibili nelle 24 ore), evidenzia tutti i genotipi del virus della malattia vescicolare dei suini ed è sufficientemente sensibile per poter essere utilizzata su campioni prelevati da soggetti clinicamente sospetti.
3. In caso di sospetta infezione subclinica o quando i campioni sono prelevati dopo la risoluzione della fase clinica oppure quando l'esame ha per oggetto campioni fecali, le tecniche PCR-TI potenziate, quali la PCR-TI annidata, l'immuno-PCR, l'ELISA-PCR e i metodi più sofisticati di estrazione dell'ARN, forniscono un sistema di rilevamento almeno altrettanto sensibile quanto il passaggio ripetuto su colture di tessuto, ma notevolmente più rapido.
4. Sequenziando circa 200 nucleotidi nel gene 1D che codifica la principale proteina strutturale VP1, è possibile raggruppare ceppi di virus della malattia vescicolare dei suini secondo l'omologia delle loro sequenze e mettere in relazione dal punto di vista epidemiologico i ceppi che provocano la malattia in zone diverse o in momenti diversi.

**D. Valutazione dei risultati degli esami virologici**

L'individuazione degli antigeni o del genoma del virus della malattia vescicolare dei suini mediante ELISA e PCR ha lo stesso valore diagnostico dell'isolamento del virus.

Tuttavia, l'isolamento del virus va considerato come test di riferimento e dev'essere utilizzato, ove necessario, come metodo di conferma, in particolare se il risultato positivo ottenuto con ELISA o PCR non è accompagnato da:

- a) Manifestazione di segni clinici della malattia;
- b) Individuazione di suini sieropositivi; oppure
- c) Un nesso epidemiologico diretto con un focolaio accertato.

## CAPITOLO VIII

**Principi e applicazioni delle prove sierologiche e valutazione dei risultati****A. Prova di neutralizzazione del virus (VN)**

1. La microprova quantitativa VN per l'individuazione dell'anticorpo del virus della malattia vescicolare dei suini viene effettuata con cellule IB-RS-2 oppure con un sistema cellulare equivalente, in piastre a fondo piatto per microtitolazione, di qualità adatta alla coltura di tessuti.
2. Il virus viene fatto sviluppare su strati monocellulari IB-RS-2 e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  dopo l'aggiunta di glicerolo al 50 % oppure a  $-70^{\circ}\text{C}$  senza aggiunta di glicerolo. I sieri vengono inattivati a  $56^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti prima di eseguire la prova.

**B. ELISA**

1. Il test ELISA per l'individuazione degli anticorpi è un ELISA competitivo basato su un anticorpo monoclonale. Se il campione di siero contiene anticorpi contro la malattia vescicolare dei suini, il legame tra un anticorpo monoclonale selezionato e coniugato alla perossidasi e l'antigene del virus sarà inibito.

In questo test, l'antigene virale è catturato in fase solida per mezzo di anticorpi monoclonali; i campioni di siero, opportunamente diluiti, vengono quindi incubati e successivamente addizionati dell'anticorpo monoclonale coniugato alla perossidasi. L'inibizione del legame dell'anticorpo monoclonale è misurata mediante un substrato e cromogeno.

2. Per determinare il periodo d'infezione del suino o dell'allevamento contaminato, può essere utile un test ELISA a cattura indiretta con anticorpi monoclonali specifici all'isotipo, che rivela le IgG o IgM suine specifiche al virus della malattia vescicolare dei suini.

In questo particolare test, l'antigene virale è catturato in fase solida per mezzo di un anticorpo che cattura l'antigene. Se il campione di siero contiene anticorpi contro la malattia vescicolare dei suini, questi sono evidenziati dall'intervento di un anticorpo monoclonale contro le IgG o le IgM del suino coniugato alla perossidasi. Il legame è misurato mediante un substrato e cromogeno.

L'ELISA specifico all'isotipo può anche servire a distinguere i veri dai falsi soggetti sieropositivi (cfr. punto C).

**C. Applicazione delle prove sierologiche e valutazione dei risultati**

1. Le prove VN ed ELISA sono gli esami sierologici raccomandati. Nel capitolo X sono enumerati i sieri di riferimento forniti dal laboratorio comunitario di riferimento al fine di normalizzare tutti gli esami sierologici condotti nella Comunità.

Il test VN va considerato come test di riferimento, pur presentando l'inconveniente di richiedere due o tre giorni per la completa esecuzione nonché la disponibilità di apparecchiature per la coltura dei tessuti.

L'ELISA è più rapido e si presta meglio ad essere normalizzato. L'ELISA competitivo con anticorpo monoclonale è il metodo più affidabile della famiglia ELISA finora descritto per l'individuazione degli anticorpi della malattia vescicolare dei suini. È particolarmente raccomandato come prova di screening su un gran numero di campioni.

Si dovrà tuttavia ricorrere alla VN come prova di conferma, ove necessario, in particolare dopo il primo accertamento di campioni positivi in un allevamento. I suini che risultano positivi con ELISA e negativi con VN non saranno presi in considerazione.

2. La presenza di un soggetto reattivo singolo o «falso positivo»<sup>(4)</sup> può essere sospettata allorché è riscontrato un unico suino sieropositivo e si verificano le seguenti condizioni:
  - a) Assenza di segni clinici della malattia nell'azienda;
  - b) Nessun precedente clinico della malattia nell'azienda;
  - c) Nessun contatto con focolai noti della malattia in passato.
3. Un animale sieropositivo si conferma in quanto soggetto reattivo singolo quando:
  - a) Da ulteriori esami di controllo non emerge alcun altro soggetto sieropositivo;
  - b) I suini in contatto sottoposti a campionamento dopo l'individuazione del soggetto reattivo singolo non rivelano sieroconversione;
  - c) Dopo ripetuti campionamenti, il titolo di anticorpi rimane costante o diminuisce.

<sup>(4)</sup> Una modesta proporzione di soggetti reattivi singoli può emergere da qualunque esame sierologico per l'accertamento della malattia vescicolare dei suini. I fattori che determinano questo fenomeno sono ignoti. Può essere dovuto ad una reattività sierologica incrociata con la malattia vescicolare dei suini, sopravvenuta per effetto di un'infezione causata da un altro picornavirus non ancora identificato, oppure ad altri fattori non specifici presenti nel siero.

4. Tuttavia, per confermare un soggetto reattivo singolo si devono prendere in considerazione anche i seguenti criteri e principi complementari:
- a) l'incidenza dei «falsi positivi» è di circa 1/1 000 capi;
  - b) i sieri dei soggetti reattivi singoli presentano generalmente il seguente profilo:
    - basso titolo di anticorpi con il test VN,
    - positività dubbia con l'ELISA competitivo a base di anticorpi monoclonali,
    - esclusivamente IgM e nessuna IgG con l'ELISA specifico all'isotipo della malattia vescicolare dei suini<sup>(?)</sup>.

## CAPITOLO IX

### *Segni clinici e caratteristiche della malattia vescicolare dei suini*

La malattia vescicolare dei suini è una malattia contagiosa causata da un enterovirus della famiglia Picornaviridae, che si presenta come un'affezione vescicolare subclinica, lieve o grave a seconda del ceppo di virus, della dose e della via di esposizione, nonché delle condizioni zootecniche in cui sono allevati i suini. Possono predisporre alla comparsa dei segni clinici anche altri fattori di stress supplementari come il trasporto, la commistione con altri suini o le temperature estreme.

La malattia è caratterizzata da scarsa febbre e da vescicole sulla cute dello spazio interungueale, sui bulbi del calcagno, sulla pelle degli arti e meno di frequente sul grugno, sulle labbra, sulla lingua e sui capezzoli. Il tasso di morbilità può arrivare al 100 %, ma la mortalità è estremamente bassa o assente.

L'infezione può evolversi in forma latente o lieve, con una semplice alterazione passeggera dello stato fisico generale dell'animale e lo sviluppo di anticorpi in grado di neutralizzare il virus nel giro di pochi giorni<sup>(6)</sup>.

A causa del suo carattere subclinico o lieve, spesso la malattia viene sospettata soltanto in seguito ad esami sierologici compiuti a fini di sorveglianza veterinaria o di certificazione all'esportazione. I recenti focolai di malattia vescicolare dei suini insorti in Europa si caratterizzavano per un quadro clinico di poca o nessuna gravità, tanto che la malattia veniva diagnosticata per lo più dopo gli esami sierologici.

Il problema è che i segni clinici della malattia vescicolare dei suini si confondono con quelli dell'afte epizootica. La presenza di vescicole deve sempre essere considerata, a priori, come caso sospetto di afte epizootica e la diagnosi differenziale dev'essere eseguita immediatamente.

Il periodo d'incubazione della malattia vescicolare dei suini nei singoli animali varia di solito dai 2 ai 7 giorni, dopodiché può sopravvenire una febbre passeggera con punte di 41 °C, senza che però i segni clinici si evidenzino nell'allevamento prima di un certo tempo. In seguito compaiono vescicole sulla cute dello spazio interungueale, più particolarmente alla giuntura con il calcagno. L'affezione può estendersi a tutto lo spazio interungueale, fino a provocare la perdita dello zoccolo. Più di rado, le vescicole appaiono anche sul grugno, particolarmente sulla superficie dorsale, sulle labbra, sulla lingua e sui capezzoli, mentre sui ginocchi si possono osservare lesioni superficiali. I suini malati possono zoppicare e rifiutare il cibo per alcuni giorni.

La malattia colpisce più gravemente i suini giovani, anche se, contrariamente all'afte epizootica, la mortalità per malattia vescicolare dei suini rimane estremamente rara anche tra i suinetti.

Sono stati segnalati disturbi nervosi, benché non frequenti. L'aborto non è un segno tipico della malattia vescicolare dei suini. L'insufficienza cardiaca dovuta a miocardite multifocale, che può essere caratteristica dell'afte epizootica e dell'encefalomiocardite, soprattutto nei suinetti, non si verifica invece nella malattia vescicolare.

La guarigione è completa in genere dopo 2-3 settimane e l'unica conseguenza apparente dell'infezione è una linea orizzontale scura sullo zoccolo, là dove la crescita si è provvisoriamente arrestata.

I suini infetti possono trasmettere il virus attraverso le secrezioni nasali, la saliva e le feci fino a 48 ore prima dell'apparizione dei segni clinici. Il virus si riproduce per lo più durante i primi 7 giorni dell'infezione, mentre la secrezione del virus attraverso il naso e la bocca cessa normalmente nel termine di 2 settimane. Il virus può essere ancora isolato nelle feci per 20 giorni dopo l'infezione e può persistervi per un massimo di 3 mesi. Esso può rimanere a lungo nel tessuto necrotico delle vescicole rotte e nelle feci.

<sup>(?)</sup> Nei campioni di siero di suini infetti dal virus della malattia vescicolare sono generalmente rinvenute sia IgG che IgM o soltanto IgG specifiche, mentre il siero dei soggetti reattivi singoli di solito contiene unicamente IgM. Le IgG specifiche non sono rilevabili nei campioni di siero di suini che hanno contratto l'infezione nel corso dei precedenti 10-14 giorni, ma dovrebbero apparire al secondo prelievo. I suini di recente infezione possono tuttavia confondersi con i falsi positivi fintantoché la loro reazione immunitaria non comincia a produrre IgG (cfr. altresì il capitolo IX e la nota 6).

<sup>(6)</sup> Le IgM specifiche sono generalmente rilevabili nel sangue 2 o 3 giorni dopo l'infezione e scompaiono all'incirca dopo 30-50 giorni; Le IgG specifiche sono generalmente rilevabili nel sangue tra 10 e 14 giorni dopo l'infezione e permangono per diversi anni. L'isotipo dell'Ig può essere determinato con il test ELISA descritto al capitolo VIII, punto B.2.

## CAPITOLO X

**Sieri di riferimento della malattia vescicolare dei suini**

Siero di riferimento	Origine	Osservazioni (7)
1	Siero suino normale	Siero di controllo negativo
2	Siero prelevato 21 giorni dopo l'infezione da un suino infetto esclusivamente dal ceppo UKG 27/72 del virus della malattia vescicolare dei suini	Siero di controllo fortemente positivo
3	Diluizione 1:10 in NPS di siero prelevato 5 giorni dopo l'infezione da un suino infetto del ceppo Italia 8/94	Siero scarsamente positivo prelevato poco tempo dopo l'infezione ad opera di un ceppo del virus della malattia vescicolare dei suini recentemente isolato in Europa. Il siero è stato diluito per ottenere una bassa positività con ELISA e VN
4	Diluizione 1:40 di siero prelevato 21 giorni dopo l'infezione da un suino infetto dal ceppo UKG 27/72	Siero scarsamente positivo che definisce il livello più basso di anticorpi che i laboratori di riferimento nazionali nell'UE possono normalmente qualificare come positivo mediante i test ELISA e VN Equivalente al siero RS 01-04-94 (8)
5	Siero prelevato 4 giorni dopo l'infezione da un suino infetto esclusivamente dal ceppo UKG 27/72	Siero scarsamente positivo proveniente da un suino recentemente infetto
6	Siero prelevato 5 giorni dopo l'infezione da un suino infetto esclusivamente dal ceppo UKG 27/72	Siero scarsamente positivo proveniente da un suino recentemente infetto

(7) Questa rubrica riporta le conclusioni emerse dall'esame di singoli suini. Per quanto riguarda la sorveglianza sierologica, va presa in considerazione la sensibilità dell'esame praticato.

(8) Cioè un siero con un titolo sufficientemente superiore alla soglia da poter risultare sempre positivo nei test ELISA e VN anche dopo ripetute prove.