

DECISIÓN DE LA COMISIÓN
de 26 de mayo de 2003
por la que se aprueba un manual de diagnóstico de la peste porcina africana

[notificada con el número C(2003) 1696]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2003/422/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 2002/60/CE del Consejo, de 27 de junio de 2002, por la que se establecen disposiciones específicas de lucha contra la peste porcina africana y se modifica, en lo que se refiere a la enfermedad de Teschen y a la peste porcina africana, la Directiva 92/119/CEE ⁽¹⁾, y, en particular, el apartado 3 de su artículo 18;

Considerando lo siguiente:

- (1) Según la Directiva 2002/60/CE, es necesario establecer uniformemente procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios de evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación de la peste porcina africana.
- (2) Según dicha Directiva, el laboratorio comunitario de referencia de la peste porcina africana debe coordinar, en consulta con la Comisión, los métodos empleados en los Estados miembros para el diagnóstico de la enfermedad, con medios como la organización periódica de pruebas comparativas y el suministro de reactivos de referencia a nivel comunitario.
- (3) El virus de la peste porcina africana no se considera un peligro para la salud humana.
- (4) Recientemente se han elaborado pruebas de laboratorio que permiten la rápida confirmación de la peste porcina africana.
- (5) La experiencia obtenida en la lucha contra la peste porcina africana en los últimos años ha permitido seleccionar los procedimientos de muestreo y los criterios de evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio más adecuados para el diagnóstico correcto de esta enfermedad en diferentes situaciones.
- (6) Por tanto, es pertinente aprobar el manual de establecimiento de dichos procedimientos y criterios.
- (7) Los laboratorios nacionales de diagnóstico deben quedar autorizados para modificar las pruebas de laboratorio establecidas o para utilizar pruebas diferentes, siempre que se pueda demostrar la equivalencia de su sensibilidad y especificidad.
- (8) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

1. Queda aprobado el manual de diagnóstico de la peste porcina africana que figura en el anexo.
2. Los Estados miembros velarán por que la confirmación de la peste porcina africana se efectúe siguiendo los procedimientos, métodos de muestreo y criterios de evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio establecidos en el manual y basados en los elementos siguientes:
 - a) la detección, en el examen clínico o en la autopsia, de signos y lesiones de la enfermedad;
 - b) la detección del virus, su antígeno o su genoma en muestras de tejidos, órganos, sangre o excrementos de los cerdos;
 - c) la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos en muestras de sangre.
3. No obstante lo dispuesto en el apartado 2, los laboratorios nacionales de diagnóstico recogidos en el anexo IV de la Directiva 2002/60/CE podrán introducir modificaciones en las pruebas de laboratorio contempladas en el manual o utilizar pruebas diferentes, siempre que pueda demostrarse que su sensibilidad y su especificidad son equivalentes.

Si se aplican pruebas modificadas o diferentes, su sensibilidad y especificidad deberán evaluarse en el contexto de las pruebas comparativas periódicas organizadas por el laboratorio comunitario de referencia en relación con la peste porcina africana.

Artículo 2

La presente Decisión será aplicable a partir del 1 de julio de 2003.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 26 de mayo de 2003.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 192 de 20.7.2002, p. 27.

ANEXO

MANUAL DE DIAGNÓSTICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA*Capítulo I***Introducción, objetivos y definiciones**

1. Con objeto de disponer de procedimientos uniformes de diagnóstico de la peste porcina africana (en lo sucesivo, «la PPA»), en el presente manual:
 - a) se determinan directrices y condiciones mínimas en relación con los procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de los exámenes clínicos, autopsias y pruebas de laboratorio con vistas al diagnóstico correcto de la PPA (⁽¹⁾);
 - b) se establece el mínimo de requisitos de bioseguridad y de normas de calidad que deben observarse en los laboratorios de diagnóstico de la PPA y en el transporte de las muestras;
 - c) se establecen las pruebas de laboratorio que han de utilizarse para el diagnóstico de la PPA y las técnicas de laboratorio para la tipificación genética de las cepas aisladas del virus de la PPA.
2. El presente manual se dirige principalmente a las autoridades encargadas de la lucha contra la PPA; por tanto, se centra en los principios y aplicaciones de las pruebas de laboratorio y en la evaluación de sus resultados, más que en el detalle de las técnicas de laboratorio.
3. A efectos del presente manual, además de aplicar las definiciones contenidas en el artículo 2 de la Directiva 2002/60/CE, se entenderá por:
 - a) «explotación sospechosa», toda explotación porcina en la que se encuentren uno o más cerdos sospechosos de estar infectados con el virus de la PPA, o una explotación de contacto según se define en la letra k) del artículo 2 de la Directiva 2002/60/CE;
 - b) «subunidad epidemiológica» o «subunidad», el local, recinto o terreno circundante en el que se mantengan grupos de cerdos dentro de una explotación, de tal manera que el contacto entre ellos, directo o indirecto, sea frecuente, pero que, al mismo tiempo, se mantengan separados de otros cerdos de esa misma explotación;
 - c) «cerdos en contacto», los cerdos que hayan vivido en una explotación, durante los últimos 21 días, en contacto directo con uno o más cerdos sospechosos de estar infectados con el virus de la PPA.

*Capítulo II***Descripción de la PPA, con especial atención al diagnóstico diferencial****A. INTRODUCCIÓN**

1. La PPA es una enfermedad provocada por un virus ADN dotado de envoltura y que pertenece al género *Asfivirus*, de la familia *Asfarviridae*. Las distintas cepas de virus de la PPA presentan diferencias de virulencia, aunque no pueden señalarse diferentes genotipos.
2. El virus de la PPA es muy estable en las excreciones de cerdos infectados, en los cuerpos de cerdo y en las carnes frescas de cerdo, así como en algunos de los productos derivados de carne de cerdo. Para garantizar su inactivación en el ambiente deben utilizarse desinfectantes adecuados.
3. La principal vía natural de infección de los cerdos en Europa es la buconasal, por contacto directo o indirecto con cerdos infectados, o por ingestión de piensos contaminados con el virus. Sin embargo, en las áreas en que hay vectores (⁽²⁾), la transmisión mediante estos vectores tiene un papel muy importante en la persistencia y propagación del virus. La PPA puede propagarse asimismo por contacto indirecto con materiales contaminados y por picaduras de insectos, que transportan mecánicamente el virus de la PPA. Es asimismo posible la transmisión de la enfermedad a través del esperma de verracos infectados.
4. Si bien el período de incubación en los animales oscila entre cinco y 15 días, en condiciones de campo los síntomas clínicos pueden no manifestarse en una explotación hasta transcurridas varias semanas desde la introducción del virus, o incluso más si se trata de cepas del virus poco virulentas.

(¹) A la hora de determinar el número de muestras que tomar para las pruebas de laboratorio, se atenderá también a la sensibilidad de las pruebas que vayan a realizarse. Si la sensibilidad de la prueba no es muy elevada, el número de animales de los que se tomen muestras será superior al indicado en el presente Manual.

(²) Según se definen en la letra r) del artículo 2 de la Directiva 2002/60/CE.

5. Pueden darse formas agudas, subagudas y crónicas de la PPA, en función principalmente de la virulencia del virus.
6. En los cerdos que se recuperan clínicamente de una infección, la viremia persiste durante un periodo de 40 a 60 días, durante el cual los cerdos son portadores del virus. Se ha aislado el virus de la PPA en cerdos portadores hasta a los seis meses de la infección.

B. FORMA AGUDA

1. La aparición de fiebre elevada (más de 40 °C) suele ser el primer signo clínico de enfermedad, junto con depresión, anorexia, respiración acelerada y difícil, y secreciones nasales y oculares. Los cerdos presentan movimientos descoordinados y se apiñan unos con otros. Las cerdas pueden abortar en cualquier fase de la gestación. Algunos cerdos pueden tener vómitos y estreñimiento, mientras que otros pueden sufrir diarreas hemorrágicas. Aparecen zonas subcutáneas congestionadas o hemorrágicas, especialmente en las extremidades y las orejas. Puede haber una fase de coma antes de la muerte, que ocurre en el plazo de uno a siete días tras la aparición de los signos clínicos. La tasa de morbimortalidad dentro de una explotación puede llegar al 100 %.

La autopsia revela un síndrome hemorrágico típico, con congestión generalizada del cuerpo, líquido hemorrágico en las cavidades torácica y abdominal, bazo oscuro y dilatado, ganglios linfáticos hemorrágicos que parecen coágulos sanguíneos, especialmente los ganglios linfáticos renales y gastrohepáticos, petequias en los riñones (en las pirámides medulares y corticales y en la pelvis renal), peritoneo, mucosa gástrica e intestinal y corazón (en el epicardio y en el endocardio), hidrotórax y petequias en la pleura.

2. En general, la forma aguda de la peste porcina clásica presenta un cuadro clínico y anatomopatológico muy parecido al de la peste porcina africana. De producirse, las hemorragias en la piel y en las orejas se detectan bastante fácilmente y hacen sospechar la presencia de peste porcina clásica o africana en su forma aguda, ya que son pocas las demás enfermedades que provocan lesiones semejantes.

Debe considerarse también la posible presencia de peste porcina africana en su forma aguda cuando existan sospechas de erisipela, síndrome reproductor y respiratorio del ganado porcino, intoxicación cumarínica, púrpura hemorrágica, síndrome multisistémico de caquexia postdestete, dermatitis porcina y síndrome de nefropatía, salmonelosis o pasteurelosis o cualquier síndrome entérico o respiratorio que curse con fiebre y no responda al tratamiento con antibióticos.

C. FORMAS SUBAGUDAS

Las formas subagudas de la enfermedad son más frecuentes en zonas endémicas. La infección subaguda se caracteriza por fiebre fluctuante, depresión y neumonía. La muerte puede producirse por insuficiencia cardíaca. Las lesiones correspondientes a la forma subaguda son similares a las de la forma aguda, pero más leves. Las lesiones características son grandes hemorragias en los ganglios linfáticos, riñones y bazo, junto con congestión y edema pulmonar, así como, en ciertos casos, neumonía intersticial.

D. FORMAS CRÓNICAS

Las formas crónicas de la enfermedad son raras. En ellas pueden observarse infecciones bacterianas secundarias. Como los signos clínicos de la PPA crónica son bastante inespecíficos, deben tenerse en cuenta otras muchas enfermedades a la hora del diagnóstico diferencial. El aumento de la temperatura corporal no se observa obligatoriamente en todos los animales, pero en una explotación infectada puede detectarse fiebre al menos en algunos cerdos.

Entre los síntomas clínicos de la PPA pueden encontrarse problemas respiratorios, abortos, artritis, necrosis o úlceras cutáneas crónicas, sin parecido con el cuadro clínico típico de las infecciones con el virus de la PPA. Las lesiones pueden ser mínimas o incluso nulas. Las observaciones histopatológicas se caracterizan por linfadenomegalia y esplenomegalia, pleuritis y pericarditis fibrinosa, y neumonía infiltrada. También se han descrito casos de necrosis caseosa focal y de mineralización de los pulmones.

Capítulo III

Directrices sobre los criterios principales que deben tenerse en cuenta para el reconocimiento de una explotación como explotación sospechosa de PPA

1. La decisión de reconocer una explotación como explotación sospechosa se tomará en función de las siguientes observaciones, criterios y motivos:
 - a) observaciones clínicas y anatomopatológicas en cerdos; las principales observaciones clínicas y anatomopatológicas que deben tenerse en cuenta son las siguientes:
 - fiebre con morbimortalidad en cerdos de todas las edades,
 - fiebre con síndrome hemorrágico; petequias y equimosis, especialmente en los ganglios linfáticos, riñones, bazo (que está dilatado y oscuro, especialmente en las formas agudas) y vejiga urinaria, así como úlceras en la vesícula biliar;

- b) observaciones epidemiológicas; las principales de ellas que deben tenerse en cuenta son las siguientes:
- si los cerdos han estado en contacto directo o indirecto con una explotación porcina de la que se haya demostrado que ha estado infectada con el virus de la PPA,
 - si una explotación ha entregado cerdos de los que se haya demostrado posteriormente que estaban infectados con el virus de la PPA,
 - si se han inseminado artificialmente cerdas con esperma de origen sospechoso,
 - si ha habido contacto directo o indirecto con jabalíes de una población afectada por la PPA,
 - si los cerdos se mantienen al aire libre en una zona en la que haya jabalíes infectados con PPA,
 - si se ha alimentado a los cerdos con residuos alimenticios y existe la sospecha de que tales residuos no hayan sido tratados de manera que se inactive el virus de la PPA,
 - si puede haber habido exposición, por ejemplo debido a la entrada de personas en la explotación, o a transportes, etc., procedentes de explotaciones infectadas o sospechosas de estar infectadas con el virus de la PPA,
 - si hay presencia de vectores en la zona de la explotación.
2. En cualquier caso, una explotación debe considerarse como explotación sospechosa si se ha planteado la sospecha de presencia de peste porcina clásica en la explotación debido a observaciones clínicas o anatomopatológicas, sin que las investigaciones clínicas, epidemiológicas y de laboratorio hayan llevado a la confirmación de esta enfermedad ni a la identificación de otros agentes o causas de enfermedad en dicha explotación.

Capítulo IV

Procedimientos de comprobación y muestreo

A. DIRECTRICES Y PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN CLÍNICO Y MUESTREO DE CERDOS PRESENTES EN EXPLOTACIONES SOSPECHOSAS

1. Los Estados miembros velarán por que se lleven a cabo los exámenes clínicos, el muestreo y las investigaciones de laboratorio pertinentes en las explotaciones sospechosas para confirmar o descartar la presencia de PPA, de acuerdo con las directrices y procedimientos establecidos en los puntos 2 a 6 que figuran a continuación.

Independientemente de la adopción de las medidas contempladas en el apartado 2 del artículo 4 de la Directiva 2002/60/CE en la explotación correspondiente, dichas directrices y procedimientos se aplicarán asimismo en caso de enfermedad siempre que la PPA entre en consideración para el diagnóstico diferencial. Quedan incluidas aquí las ocasiones en que los signos clínicos y el patrón epidemiológico que se observen en los cerdos sugieran una probabilidad muy baja de presencia de PPA.

En todos los demás casos en que se sospeche que uno o más cerdos están infectados con el virus de la PPA, se adoptarán en la explotación sospechosa correspondiente las medidas contempladas en el apartado 2 del artículo 4 de la Directiva 2002/60/CE.

En caso de sospecha de presencia de PPA en cerdos que se encuentren en un matadero o en un medio de transporte, se aplicarán asimismo, *mutatis mutandis*, las directrices y procedimientos contemplados en los puntos 2 a 6 siguientes.

2. Cuando un veterinario oficial visite una explotación sospechosa para confirmar o descartar la presencia de PPA:
- se comprobarán los registros sanitarios y de producción de la explotación, en caso de que se disponga de tales registros; se efectuará una inspección de cada subunidad de la explotación para seleccionar los cerdos que se vayan a someter a examen clínico.

El examen clínico incluirá la medida de la temperatura corporal y se hará principalmente con los cerdos o grupos de cerdos siguientes:

- cerdos enfermos o anoréxicos,
- cerdos que se hayan introducido recientemente desde focos confirmados o desde otros lugares de origen sospechosos,
- cerdos mantenidos en subunidades visitadas recientemente por visitantes externos que hubieran estado en contacto estrecho y reciente con cerdos infectados o sospechosos de PPA, o en relación con los cuales se hubieran detectado otros contactos de riesgo especial con un posible lugar de origen del virus de la PPA,
- cerdos que ya hayan sido objeto de muestreo y pruebas serológicas en relación con la PPA, en caso de que los resultados de tales pruebas no permitan descartar la presencia de PPA, y cerdos en contacto con ellos,
- cerdos que se hayan recuperado recientemente de una enfermedad.

Si la inspección de la explotación sospechosa no revela la presencia de los cerdos o grupos de cerdos contemplados en el párrafo anterior, la autoridad competente, sin perjuicio de otras medidas que puedan aplicarse en la explotación de acuerdo con la Directiva 2002/60/CE y teniendo en cuenta la situación epidemiológica:

- realizará más exámenes en la explotación correspondiente de acuerdo con el punto 3 siguiente, o
 - velará por que se tomen muestras de sangre para análisis de laboratorio de los cerdos que se encuentren en la explotación correspondiente; en tal caso, se utilizarán como referencia los procedimientos de muestreo establecidos en el punto 5 siguiente y en el punto 2 de la letra F, o
 - adoptará o mantendrá las medidas establecidas en el apartado 2 del artículo 4 de la Directiva 2002/60/CE, a la espera de que se realicen nuevas investigaciones en la explotación correspondiente, o
 - descartará la sospecha de presencia de PPA.
3. Cuando se haga referencia al presente punto, el examen clínico de la explotación correspondiente se realizará con cerdos seleccionados aleatoriamente en las subunidades en las cuales se haya detectado, o se sospeche que pueda haber, riesgo de introducción del virus de la PPA.

El número mínimo de cerdos que se examinen deberá permitir la detección de fiebre en estas subunidades con una confianza del 95 % si se da con una prevalencia del 10 %.

4. Si en una explotación sospechosa se detectan cerdos muertos o moribundos, se realizarán las autopsias, preferentemente al menos de cinco de ellos y en particular de los cerdos:
- que muestren signos muy evidentes de enfermedad antes de la muerte,
 - que presenten fiebre elevada,
 - recién muertos.

Si estos exámenes no ponen de manifiesto ninguna lesión que sugiera la presencia de PPA pero, debido a la situación epidemiológica, se considera necesario proceder a más investigaciones:

- se realizará un examen clínico, según se contempla en el punto 3, y una toma de sangre, según se contempla en el punto 5, en la subunidad en que estuvieran los cerdos muertos o moribundos,
- podrán realizarse las autopsias de 3 o 4 cerdos que estuvieran en contacto, especialmente si muestran signos clínicos.

Independientemente de la presencia o ausencia de lesiones indicativas de PPA, se tomarán muestras de los órganos o tejidos de los cerdos que se hayan sometido a autopsia, a fin de realizar con ellas pruebas virológicas de acuerdo con el punto 1 de la letra B del capítulo V. Estas muestras se tomarán preferentemente de cerdos recién muertos.

Cuando se realicen autopsias, la autoridad competente velará por que:

- se tomen las medidas higiénicas y precauciones necesarias para evitar la propagación de cualquier enfermedad,
 - los cerdos moribundos se maten de forma humanitaria, con arreglo a la Directiva 93/119/CEE del Consejo, de 22 de diciembre de 1993, relativa a la protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza ⁽¹⁾, modificada por el Reglamento (CE) n° 806/2003 ⁽²⁾.
5. Si en una explotación sospechosa se detectan otros signos clínicos o lesiones que puedan sugerir la presencia de PPA, pero la autoridad competente considera que estas observaciones no son suficientes para confirmar un foco de PPA y que, por tanto, han de realizarse pruebas de laboratorio, será necesario tomar muestras de sangre, para estas pruebas de laboratorio, de los cerdos sospechosos y de otros cerdos de cada subunidad en que se encuentren los cerdos sospechosos, de acuerdo con lo siguiente:
- a) el número mínimo de muestras que se tomen para las pruebas serológicas ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 10 % en la subunidad correspondiente con una confianza del 95 %;
 - b) el número de muestras que se tomen para las pruebas virológicas se ajustará a las instrucciones de la autoridad competente, que tendrán en cuenta la gama de pruebas que puedan realizarse, la sensibilidad de las pruebas de laboratorio que se vayan a utilizar y la situación epidemiológica.

⁽¹⁾ DO L 340 de 31.12.1993, p. 21.

⁽²⁾ DO L 122 de 16.5.2003, p. 1.

6. Si, tras el examen realizado en una explotación sospechosa, no se detectan signos clínicos ni lesiones que sugieran la presencia de PPA, pero la autoridad competente considera que han de realizarse más pruebas de laboratorio para excluir la posibilidad de PPA, servirán de referencia las instrucciones de muestreo contempladas en el punto 5.

B. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN UNA EXPLOTACIÓN CUANDO SE MATEN CERDOS PREVIA CONFIRMACIÓN DE LA ENFERMEDAD

1. Para poder determinar cómo se ha introducido el virus de la PPA en una explotación infectada y el período transcurrido desde dicha introducción, cuando, de acuerdo con la letra a) del apartado 1 del artículo 5 de la Directiva 2002/60/CE, se maten cerdos en una explotación tras la confirmación de un foco, se tomarán aleatoriamente muestras de sangre de los cerdos cuando se maten, a fin de someterlas a pruebas serológicas.
2. El número mínimo de cerdos de los que deben tomarse muestras ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 10 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %⁽¹⁾.

Las muestras destinadas a las pruebas virológicas se ajustarán a las instrucciones de la autoridad competente, que tendrán en cuenta la gama de pruebas que puedan realizarse, la sensibilidad de las pruebas de laboratorio que se vayan a utilizar y la situación epidemiológica.

En las zonas en que se haya demostrado previamente la presencia de vectores infectados con el virus de la PPA, deberán tomarse también conjuntos adecuados de garrapatas blandas para someterlas a las pruebas virológicas, de acuerdo con las instrucciones de la autoridad competente y con el anexo III de la Directiva 2002/60/CE.

3. Sin embargo, en caso de focos secundarios, la autoridad competente podrá apartarse de lo establecido en los puntos 1 y 2 anteriores y adoptar otros procedimientos de muestreo, teniendo en cuenta la información epidemiológica ya disponible sobre el lugar de origen y el medio de introducción del virus en la explotación y la posible propagación de la enfermedad a partir de la explotación.

C. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO CUANDO SE MATEN CERDOS COMO MEDIDA PREVENTIVA EN UNA EXPLOTACIÓN SOSPECHOSA

1. Para poder confirmar o excluir la presencia de PPA y obtener información epidemiológica adicional, cuando, de acuerdo con lo establecido en la letra a) del apartado 3 del artículo 4 o en el apartado 2 del artículo 7 de la Directiva 2002/60/CE, se maten cerdos como medida preventiva en una explotación sospechosa, se tomarán, siguiendo el procedimiento establecido en el punto 2, muestras de sangre para realizar pruebas serológicas, así como muestras de sangre para realizar pruebas virológicas.

2. Las muestras se tomarán principalmente:

- de cerdos con signos o con lesiones observadas en la autopsia que indiquen la presencia de PPA, así como de cerdos en contacto con ellos,
- de otros cerdos que puedan haber estado en contacto de riesgo con cerdos infectados o sospechosos, o que sean sospechosos de haberse contaminado con el virus de la PPA; las muestras de estos cerdos se tomarán de acuerdo con las instrucciones de la autoridad competente, que tendrán en cuenta la situación epidemiológica.

Por otra parte, se tomarán aleatoriamente muestras de cerdos procedentes de cada una de las subunidades de la explotación⁽²⁾. En tal caso, el número mínimo de muestras que deben tomarse para realizar pruebas serológicas ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 10 % en la subunidad correspondiente con una confianza del 95 %.

El tipo de muestras que se tomen para las pruebas virológicas y las pruebas que se efectúen se ajustarán a las instrucciones de la autoridad competente, que tendrán en cuenta la gama de pruebas que puedan realizarse, la sensibilidad de estas pruebas y la situación epidemiológica.

⁽¹⁾ No obstante, si se ha aplicado la excepción contemplada en el apartado 1 del artículo 6 de la Directiva 2002/60/CE, el muestreo debe hacerse en las subunidades de la explotación en las que se hayan matado cerdos, sin perjuicio de otros exámenes y muestreos que se efectúen con los cerdos restantes de la explotación, los cuales se realizarán de acuerdo con las instrucciones de la autoridad competente.

⁽²⁾ Sin embargo, si la autoridad competente ha limitado la aplicación de la matanza preventiva sólo a la parte de la explotación en que se encontraban los cerdos sospechosos de estar infectados o contaminados con el virus de la PPA, de acuerdo con la letra a) del apartado 3 del artículo 4 de la Directiva 2002/60/CE, el muestreo debe referirse a las subunidades de la explotación en que se haya aplicado esta medida, sin perjuicio de otros exámenes y muestreos que se lleven a cabo con los restantes cerdos de la explotación, de acuerdo con las instrucciones de la autoridad competente.

D. PROCEDIMIENTOS DE COMPROBACIÓN Y MUESTREO ANTES DE QUE SE CONCEDA LA AUTORIZACIÓN PARA TRASLADAR CERDOS DESDE EXPLOTACIONES SITUADAS EN ZONAS DE PROTECCIÓN O VIGILANCIA Y EN CASO DE QUE ESTOS CERDOS SE SACRIFIQUEN O MATEN (ARTÍCULOS 10 Y 11 DE LA DIRECTIVA 2002/60/CE)

1. Sin perjuicio de lo dispuesto en el segundo párrafo de la letra f) del apartado 1 del artículo 11 de la Directiva 2002/60/CE, para que pueda autorizarse el traslado de cerdos desde explotaciones situadas en zonas de protección o vigilancia de acuerdo con el apartado 3 del artículo 10 de dicha Directiva, el examen clínico que ha de realizar un veterinario oficial deberá:

- llevarse a cabo en las 24 horas anteriores al traslado de los cerdos,
- ajustarse a lo dispuesto en el punto 2 de la letra A.

2. En caso de cerdos que se vayan a trasladar a otra explotación, además de las investigaciones que hayan de realizarse de acuerdo con el punto 1 anterior, se llevará a cabo un examen clínico de cerdos de cada subunidad de la explotación en que se encuentren los cerdos que se vayan a trasladar, incluida la medida de la temperatura de parte de ellos.

El número mínimo de cerdos que se examinen deberá permitir la detección de fiebre en estas subunidades con una confianza del 95 % si se da con una prevalencia del 10 %.

3. En caso de cerdos que se vayan a trasladar a un matadero, a un centro de transformación o a otro lugar para su matanza o sacrificio, además de las investigaciones que hayan de realizarse de acuerdo con el punto 1 anterior, se llevará a cabo un examen clínico de cerdos de cada subunidad en que se encuentren los cerdos que se vayan a trasladar. Cuando se trate de cerdos de más de tres o cuatro meses de edad, este examen incluirá la medida de la temperatura de parte de los cerdos.

El número mínimo de cerdos que se examinen deberá permitir la detección de fiebre en las subunidades correspondientes con una confianza del 95 % si se da con una prevalencia del 20 %.

4. En el momento en que se sacrifiquen o maten los cerdos contemplados en el punto 3, deberán tomarse muestras de sangre para realizar pruebas serológicas, o muestras de sangre o de órganos como las amígdalas, el bazo o los ganglios linfáticos para realizar pruebas virológicas, de cerdos procedentes de cada una de las subunidades a partir de las cuales se hayan trasladado cerdos.

El número mínimo de muestras que se tomen deberá permitir la detección, con una confianza del 95 %, de una seroprevalencia o una prevalencia del virus del 10 % en cada subunidad.

El tipo de muestras que se tomen y las pruebas que se efectúen se ajustarán a las instrucciones de la autoridad competente, que tendrán en cuenta la gama de pruebas que puedan realizarse, la sensibilidad de estas pruebas y la situación epidemiológica.

5. Sin embargo, si al matar o sacrificar los cerdos se observan signos clínicos o lesiones en la autopsia que sugieran la presencia de PPA, no obstante lo dispuesto en el punto 4 anterior, se aplicarán las disposiciones sobre muestreo contempladas en la letra C.
6. La excepción contemplada en el apartado 5 del artículo 10 y en el apartado 4 del artículo 11 de la Directiva 2002/60/CE podrá concederse si las autoridades competentes garantizan que también se aplica un programa intensivo de muestreo y pruebas a los grupos de cerdos que deben someterse a comprobación o muestreo según los puntos 2, 3 y 4 anteriores. En el contexto de dicho programa, el número mínimo de muestras de sangre que deben tomarse ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 5 % en el grupo correspondiente de cerdos con una confianza del 95 %.

E. PROCEDIMIENTOS DE COMPROBACIÓN Y MUESTREO EN EXPLOTACIONES EN RELACIÓN CON UNA REPOBLACIÓN

1. Cuando se repongan cerdos en una explotación de acuerdo con el apartado 3 del artículo 13 de la Directiva 2002/60/CE, deberán seguirse los procedimientos de muestreo siguientes:

- se tomarán muestras de sangre cuando hayan pasado al menos 45 días desde la reposición de los cerdos,
- en caso de que se repongan cerdos testigo, se tomarán aleatoriamente muestras de sangre para efectuar pruebas serológicas de un número de cerdos que permita la detección de una seroprevalencia del 10 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %,
- en caso de repoblación total, se tomarán aleatoriamente muestras de sangre para efectuar pruebas serológicas de un número de cerdos que permita la detección de una seroprevalencia del 20 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %.

2. Cuando se repongan cerdos en una explotación de acuerdo con el apartado 4 del artículo 13 de la Directiva 2002/60/CE, deberán seguirse los procedimientos de muestreo siguientes:
 - se tomarán muestras de sangre cuando hayan pasado al menos 45 días desde la reposición de los cerdos,
 - en caso de que se repongan cerdos testigo, se tomarán aleatoriamente muestras de sangre para efectuar pruebas serológicas de un número de cerdos que permita la detección de una seroprevalencia del 5 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %,
 - en caso de repoblación total, se tomarán aleatoriamente muestras de sangre para efectuar pruebas serológicas de un número de cerdos que permita la detección de una seroprevalencia del 10 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %.

Después, cuando hayan pasado al menos 60 días desde la repoblación total, deberá repetirse el procedimiento establecido en el tercer guión anterior.

3. Tras una reposición de cerdos, la autoridad competente velará por que, en caso de cualquier enfermedad o muerte de los cerdos de la explotación por causas desconocidas, los cerdos correspondientes se sometan inmediatamente a pruebas para detectar la presencia de PPA.

Estas disposiciones serán aplicables hasta que se suspendan en la explotación correspondiente las restricciones de los movimientos de los cerdos contempladas en las letras a) y b) del apartado 3 y en el apartado 4 del artículo 13 de la Directiva 2002/60/CE.

F. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN EXPLOTACIONES DE LA ZONA DE PROTECCIÓN ANTES DE LA SUSPENSIÓN DE LAS RESTRICCIONES

1. A fin de que las medidas contempladas en el artículo 10 de la Directiva 2002/60/CE puedan suspenderse en una zona de protección, en todas las explotaciones de la zona:
 - deberá realizarse un examen clínico de acuerdo con los procedimientos contemplados en los puntos 2 y 3 de la letra A,
 - deberán tomarse muestras de sangre para realizar pruebas serológicas como se indica en el punto 2 siguiente.
2. El número mínimo de muestras de sangre que se tome ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 10 % en cerdos de cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %.

Sin embargo, la excepción prevista en el apartado 5 del artículo 10 y en el apartado 4 del artículo 11 de la Directiva 2002/60/CE podrá concederse sólo si la autoridad competente garantiza que el número de muestras de sangre tomadas permite la detección de una seroprevalencia del 5 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %.

G. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN EXPLOTACIONES DE LA ZONA DE VIGILANCIA ANTES DE LA SUSPENSIÓN DE LAS RESTRICCIONES

1. A fin de que las restricciones contempladas en el artículo 11 de la Directiva 2002/60/CE puedan suspenderse en una zona de vigilancia, deberá realizarse un examen clínico en todas las explotaciones de la zona en conformidad con los procedimientos establecidos en el punto 2 de la letra A.

Por otra parte, se tomarán muestras de sangre para realizar pruebas serológicas de cerdos:

- de toda otra explotación en que la autoridad competente considere necesario proceder a un muestreo,
 - de todos los centros de recogida de esperma.
2. Cada vez que se tomen muestras de sangre para realizar pruebas serológicas en explotaciones situadas en la zona de vigilancia, el número de tales muestras deberá ajustarse a lo establecido en la primera frase del punto 2 de la letra F.

Sin embargo, la excepción prevista en el apartado 5 del artículo 10 y en el apartado 4 del artículo 11 de la Directiva 2002/60/CE podrá concederse sólo si la autoridad competente garantiza que se toman muestras de sangre, para realizar pruebas serológicas, en cada una de las explotaciones situadas en la zona. El número mínimo de muestras de sangre que se tome ha de permitir la detección de una seroprevalencia del 5 % en cada subunidad de la explotación con una confianza del 95 %.

H. SEGUIMIENTO SEROLÓGICO Y PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN ZONAS EN QUE SE SOSPECHE O SE HAYA CONFIRMADO LA PRESENCIA DE PPA ENTRE JABALÍES

1. En caso de seguimiento serológico de jabalíes en zonas en que se sospeche o se haya confirmado la presencia de PPA, deberán definirse previamente el tamaño y la zona geográfica de la población que se vaya a muestrear, a fin de definir el número de muestras que tomar. El tamaño de la muestra deberá establecerse en función del número estimado de animales vivos y no en función del número de animales abatidos.
2. Si no se dispone de datos sobre el tamaño y la densidad de la población, la zona geográfica dentro de la cual se han de tomar las muestras deberá delimitarse teniendo en cuenta la presencia continua de jabalíes y la existencia de obstáculos naturales o artificiales que impidan eficazmente el amplio y continuo movimiento de los animales. Cuando no se den tales circunstancias, o en caso de zonas grandes, se recomienda delimitar zonas de muestreo de unos 200 km², en las que pueda vivir normalmente una población aproximada de entre 400 y 1 000 jabalíes.
3. Sin perjuicio de lo dispuesto en la letra c) del apartado 2 del artículo 15 de la Directiva 2002/60/CE, el número mínimo de cerdos de los que se tomen muestras dentro de la zona delimitada de muestreo deberá permitir la detección de una seroprevalencia del 5 % con una confianza del 95 %. Con este objetivo, deberán tomarse muestras de al menos 56 animales dentro de cada zona delimitada.
4. La recogida de muestras para efectuar pruebas virológicas de jabalíes abatidos o encontrados muertos deberá ajustarse a lo dispuesto en el punto 1 de la letra B del capítulo V.

Cuando se considere necesario proceder al seguimiento virológico de los jabalíes abatidos, se efectuará principalmente con animales de menos de un año de edad.

5. Todas las muestras que se envíen al laboratorio irán acompañadas del cuestionario contemplado en la letra h) del apartado 3 del artículo 16 de la Directiva 2002/60/CE.

Capítulo V

Crterios y procedimientos generales para la recogida y transporte de muestras

A. CRITERIOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Antes de efectuar el muestreo de una explotación sospechosa, será necesario preparar un plano de la explotación y delimitar las subunidades epidemiológicas de la misma.
2. Cada vez que se considere que podría ser necesario proceder a un nuevo muestreo de cerdos, todos los animales de los que se tomen muestras se marcarán inequívocamente de forma que sea fácil tomar nuevas muestras de los mismos.
3. Todas las muestras deberán enviarse al laboratorio acompañadas por los documentos apropiados, de acuerdo con los requisitos establecidos por la autoridad competente. Estos documentos contendrán datos sobre los antecedentes de los cerdos de que procedan las muestras y sobre los signos clínicos o las lesiones observadas en la autopsia.

En caso de cerdos mantenidos en explotaciones, deberá incluirse información clara sobre la edad, la categoría y la explotación de origen de los cerdos de que procedan las muestras. Se recomienda que, junto con la marca inequívoca de identificación, se registre la ubicación en la explotación de cada cerdo utilizado en el muestreo.

B. RECOGIDA DE MUESTRAS PARA LAS PRUEBAS VIROLÓGICAS

1. Para la detección del virus de la PPA, de su antígeno o de su genoma, a partir de cerdos muertos o matados, las muestras más adecuadas son los tejidos de las amígdalas, ganglios linfáticos (gastrohepáticos, renales, submandibulares y retrofaríngeos), bazo, riñones y pulmones⁽¹⁾. En caso de cuerpos autolisados, la muestra recomendada será un hueso largo completo o el esternón.
2. De los cerdos que presenten fiebre u otros signos de enfermedad se tomarán muestras de sangre con anticoagulante o de sangre coagulada, de acuerdo con las instrucciones de la autoridad competente.

⁽¹⁾ Se recomienda tomar también muestras del fleón, ya que pueden ser útiles para el diagnóstico de la peste porcina clásica.

C. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

1. Se recomienda que todas las muestras:

- se identifiquen adecuadamente,
- se transporten y conserven en recipientes estancos,
- se mantengan frías en frigorífico; sin embargo, cuando se espere que las muestras tarden más de 48 horas en llegar al laboratorio, habrá que ponerse en contacto con éste para obtener instrucciones respecto a las condiciones de temperatura más adecuadas durante el transporte,
- se entreguen al laboratorio lo antes posible,
- se mantengan frías en un recipiente con acumuladores de frío o con hielo seco,
- de tejidos u órganos se coloquen por separado en recipientes de plástico, que serán precintados y etiquetados adecuadamente; después deberán ponerse en recipientes más grandes y rodearse de suficiente material absorbente que las proteja de los golpes y absorba las eventuales fugas,
- siempre que resulte posible, sean transportadas directamente al laboratorio por una persona competente de forma rápida y fiable.

2. El exterior del envase deberá ir etiquetado con la dirección del laboratorio receptor y en él figurará de forma destacada el rótulo siguiente:

Material patológico animal — Perecedero — Frágil — No abrir fuera de un laboratorio de PPA.

3. El responsable del laboratorio receptor de las muestras será informado a su debido tiempo de la llegada de las mismas.

4. Para el transporte aéreo de muestras al laboratorio comunitario de referencia de la PPA ⁽¹⁾, el paquete habrá de etiquetarse de acuerdo con las normas de la IATA.

Capítulo VI

Principios y utilización de las pruebas virológicas y evaluación de sus resultados

A. DETECCIÓN DEL ANTÍGENO VÍRICO

1. Prueba de inmunofluorescencia directa (PIFD)

La prueba se basa en la detección microscópica de antígenos del virus en frotis de impresión de finas criosecciones de material de órganos procedentes de cerdos sospechosos de estar infectados con el virus de la PPA. Se detectan antígenos intracelulares utilizando anticuerpos específicos conjugados con ITF ⁽²⁾. En el citoplasma de las células infectadas aparecen cuerpos o gránulos de inclusión fluorescentes.

Los órganos adecuados son los riñones, el bazo y diferentes ganglios linfáticos. En caso de jabalíes, puede utilizarse asimismo un frotis de células de médula ósea si sus órganos no están disponibles o están autolisados.

La prueba puede realizarse en el plazo de dos horas. Como las muestras de órganos sólo pueden obtenerse de animales muertos, su valor con fines de cribado es limitado.

Se trata de una prueba muy sensible para casos de PPA aguda. Con las formas subagudas o crónicas, la PIFD presenta una sensibilidad tan sólo de alrededor del 40 %, debido probablemente a la presencia de complejos antígeno-anticuerpo que bloquean la reacción con el anticuerpo conjugado de la PPA. La confianza en el resultado de la prueba puede verse limitada si la tinción es dudosa, especialmente cuando no se tiene bastante experiencia con la realización de la prueba o si los órganos estudiados están autolisados.

2. ELISA para la detección del antígeno

El antígeno vírico puede detectarse asimismo aplicando técnicas ELISA, pero sólo se recomienda en relación con las formas agudas de la enfermedad, por su baja sensibilidad en presencia de complejos antígeno-anticuerpo. La sensibilidad de la prueba ELISA de detección del antígeno debe ser suficiente para dar resultado positivo con animales que presenten signos clínicos de PPA aguda. En cualquier caso, se recomienda utilizar esta prueba sólo como «prueba de rebaños» y junto con otra prueba virológica.

⁽¹⁾ El laboratorio comunitario de referencia tiene una licencia abierta para recibir muestras con fines de diagnóstico y cepas aisladas de virus de la PPA a partir de cualquier otro Estado miembro. Si la muestra procede de fuera de la Unión Europea, podrá pedirse a este laboratorio, antes del transporte, una copia del permiso de importación para adjuntarlo en un sobre pegado al exterior del paquete.

⁽²⁾ Iotiocianato de fluoresceína.

B. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS CON LA PRUEBA DE HEMADSORCIÓN (PHA)

1. El aislamiento del virus se basa en la inoculación de material de la muestra en cultivos celulares primarios sensibles de origen porcino, de monocitos y macrófagos. Las mejores muestras para el aislamiento del virus de la PPA son los leucocitos y la sangre completa obtenidos de muestras de sangre no coagulada o de los órganos contemplados en el punto 1 de la letra A. Si el virus de la PPA está presente en la muestra, se replicará en las células y producirá un efecto citopático característico en las células infectadas.
2. La PHA se recomienda para identificar cepas de virus de PPA debido a su elevada sensibilidad y especificidad. La PHA se basa en la capacidad del virus de la PPA para replicarse en macrófagos de cerdo e inducir la hemadsorción en presencia de eritrocitos de este animal. Alrededor de los macrófagos infectados se forma una roseta característica de eritrocitos. Sin embargo, es posible que un pequeño número de cepas de campo del virus de la PPA no induzca la hemadsorción, aunque sí produzcan efectos citopáticos. Estas cepas pueden identificarse específicamente aplicando la PIFD a los sedimentos de los cultivos celulares o mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
3. El aislamiento del virus se presta más a la investigación de muestras de un pequeño número de animales que a la vigilancia a gran escala. El procedimiento de aislamiento del virus exige mucho trabajo y de uno a tres días antes de proporcionar resultados. Puede ser necesario hacer otros dos pases por cultivos celulares para detectar el virus si está presente en la muestra sólo en pequeña cantidad. Esto puede hacer que la investigación se prolongue hasta 10 días antes de la obtención de un resultado final. Las muestras autolisadas pueden ser citotóxicas para el cultivo celular y limitar así su utilidad.
4. Se recomienda efectuar el aislamiento y la identificación del virus mediante la PHA como prueba de referencia para la confirmación de un resultado positivo anterior obtenido con una prueba ELISA, reacción en cadena de la polimerasa o PIFD. También se recomienda cuando ya se haya confirmado la presencia de PPA por otros métodos, especialmente si se trata de un caso o foco primario de PPA.

Para la caracterización de los virus y la epidemiología molecular pueden utilizarse virus de la PPA aislados en macrófagos de cerdos.

5. Todas las cepas de virus de la PPA aisladas de todos los focos primarios, casos primarios en jabalíes o casos en mataderos o medios de transporte deben ser caracterizadas por un laboratorio nacional de referencia de los Estados miembros o por cualquier otro laboratorio autorizado por el Estado miembro correspondiente o por el laboratorio comunitario de referencia, según lo dispuesto en la letra E.

En cualquier caso, estas cepas de virus deben enviarse inmediatamente al laboratorio comunitario de referencia para su colección de virus.

C. DETECCIÓN DEL GENOMA VÍRICO

1. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se aplica a la detección del genoma vírico en muestras de sangre, suero, tejidos u órganos. Mediante esta reacción se amplifican pequeños fragmentos de ADN vírico hasta obtener cantidades detectables. Utilizando cebadores de una región muy conservada del genoma puede detectarse una amplia gama de cepas pertenecientes a todos los genotipos conocidos del virus, con inclusión de virus no hemadsorbentes y de cepas de escasa virulencia. Como esta prueba sólo detecta una secuencia de genoma del virus, la RCP puede dar resultado positivo incluso aunque no se detecte ningún virus infeccioso por aislamiento del virus (por ejemplo, en tejidos autolisados o en muestras procedentes de cerdos convalecientes o de cerdos que se hayan recuperado y convertido en clínicamente normales).
2. La RCP puede emplearse con un número limitado de muestras seleccionadas cuidadosamente de los animales sospechosos. Es el método recomendado con muestras de órganos que sean citotóxicas, por lo que no sería posible someterlas a pruebas de aislamiento del virus (por ejemplo, muestras de jabalíes).
3. Constituyen un buen material de muestra para la RCP los órganos indicados para el aislamiento del virus y el suero. También pueden analizarse por RCP los homogeneizados de garrapatas.
4. La RCP puede realizarse en un solo día de trabajo. Requiere un equipo apropiado de laboratorio, instalaciones aparte y un personal adiestrado. Tiene la ventaja de que no es necesario replicar en el laboratorio el virus infeccioso. La RCP es muy sensible, pero se pueden producir fácilmente contaminaciones que originan falsos resultados positivos. Por tanto, son imprescindibles unos procedimientos estrictos de control de calidad.

D. PRUEBAS VIROLÓGICAS RECOMENDADAS Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las pruebas virológicas son fundamentales para confirmar la PPA.

El aislamiento del virus y la PHA deben considerarse como las pruebas virológicas de referencia y utilizarse como pruebas de confirmación cuando sea necesario. Se recomiendan particularmente en caso de que unos resultados positivos obtenidos con la PIFD o con la RCP no estén relacionados con la detección de signos clínicos o lesiones patológicas, y en cualquier otro caso dudoso.

Sin embargo, es posible confirmar un foco primario de PPA si se han detectado en los cerdos correspondientes signos clínicos o lesiones patológicas y han dado resultado positivo al menos dos pruebas distintas de detección del antígeno, del genoma o de anticuerpos con muestras tomadas del mismo cerdo sospechoso.

Es posible confirmar un foco secundario de PPA si, además de la relación epidemiológica con un caso o foco confirmado, se han detectado en los cerdos correspondientes signos clínicos o lesiones patológicas y ha dado resultado positivo una prueba de detección del antígeno, del genoma o de anticuerpos.

Un caso primario de PPA en jabalíes puede confirmarse por el aislamiento del virus o si han dado resultado positivo al menos dos pruebas de detección del antígeno, del genoma o de anticuerpos. Pueden confirmarse otros casos de PPA en jabalíes de los que se haya encontrado una relación epidemiológica con casos confirmados previamente si ha dado resultado positivo una prueba de detección del antígeno, del genoma o de anticuerpos.

E. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DEL VIRUS DE LA PPA

1. La caracterización genética de cepas del virus de la PPA se consigue determinando los perfiles de enzimas de restricción y las secuencias nucleotídicas de porciones del genoma vírico. La similitud de estos perfiles de restricción o secuencias con los ya obtenidos de cepas de virus aisladas anteriormente puede indicar si un brote de la enfermedad se debe a un virus que responde a un modelo molecular europeo o africano.

La caracterización genética de las cepas aisladas del virus de la PPA reviste la mayor importancia para mejorar el conocimiento que se tiene de la epidemiología molecular de la PPA y de la variación genética de los virus. Los datos moleculares permiten la clasificación de las nuevas cepas aisladas y proporcionan información sobre su posible origen.

2. Si la caracterización molecular del virus no puede realizarse dentro de un breve plazo en un laboratorio nacional ni en algún otro laboratorio autorizado para realizar el diagnóstico de la PPA, la muestra original o la cepa aislada se enviará lo antes posible al laboratorio comunitario de referencia para su caracterización molecular.

Los datos sobre análisis con enzimas de restricción y sobre secuenciación de las cepas de virus de la PPA de que dispongan los laboratorios autorizados para el diagnóstico de esta enfermedad deberán enviarse al laboratorio comunitario de referencia a fin de que esta información se introduzca en la base de datos que lleva dicho laboratorio.

La información incluida en esta base de datos estará a disposición de todos los laboratorios nacionales de referencia de los Estados miembros. Sin embargo, a efectos de publicación en revistas científicas, previa petición del laboratorio correspondiente, el laboratorio comunitario de referencia velará por la confidencialidad de estos datos hasta que estén publicados.

Capítulo VII

Principios y utilización de las pruebas serológicas y evaluación de sus resultados

A. PRINCIPIOS BÁSICOS Y VALOR PARA EL DIAGNÓSTICO

1. La detección de anticuerpos específicos de la PPA se recomienda en relación con las formas subagudas y crónicas, así como con la realización de pruebas a gran escala y con programas de erradicación de la PPA, por diversos motivos:
 - i) en el cerdo infectado se producen rápidamente anticuerpos, los cuales se suelen detectar en muestras de suero de estos cerdos cuando han pasado de siete a diez días desde la infección;
 - ii) no se dispone de vacunas contra la PPA, lo que significa que la inducción de anticuerpos específicos contra la PPA sólo se debe a la infección con el virus de esta enfermedad;
 - iii) la larga duración de la respuesta de anticuerpos; en cerdos que se han recuperado de la enfermedad pueden detectarse anticuerpos específicos a niveles elevados durante muchos meses o incluso durante toda la vida de algunos de estos cerdos.

Sin embargo, durante las diez primeras semanas de vida es posible detectar en lechones anticuerpos de origen materno, específicos contra el virus de la PPA. La semivida de los anticuerpos maternos en lechones es de unas tres semanas. Es muy poco probable que tengan origen materno los anticuerpos contra la PPA encontrados en lechones de más de tres meses.

2. La detección de anticuerpos contra el virus de la PPA en suero o plasma exudado de los órganos presentados se lleva a cabo como ayuda al diagnóstico de esta enfermedad en explotaciones sospechosas, para establecer la fecha de introducción de la infección en caso de un foco confirmado y con fines de seguimiento y vigilancia.

La localización de cerdos seropositivos en la explotación puede dar información valiosa sobre la manera y el momento de la introducción en ella del virus de la PPA.

Sin embargo, debe realizarse una evaluación precisa de los resultados de las pruebas serológicas teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas, virológicas y epidemiológicas, en el marco de la encuesta que se realice en caso de sospecha o confirmación de la presencia de PPA, de acuerdo con el artículo 8 de la Directiva 2002/60/CE.

B. PRUEBAS SEROLÓGICAS RECOMENDADAS

1. Las pruebas preferidas para la confirmación serológica de la PPA son la ELISA, la de inmunofluorescencia indirecta (PIFI) y la de inmunotransferencia (borrones).

La calidad y la eficacia del diagnóstico serológico realizado por los laboratorios nacionales deben comprobarse periódicamente en el ámbito de la prueba comparativa entre laboratorios organizada regularmente por el laboratorio comunitario de referencia.

2. La prueba ELISA es la más fiable y útil para estudios serológicos a gran escala. Se basa en la detección de anticuerpos contra el virus de la PPA ligados a las proteínas víricas, las cuales se unen a una fase sólida mediante la adición de un conjugado de proteína A con una enzima, que produce una reacción coloreada visible en presencia del sustrato adecuado.
3. Los laboratorios nacionales deben efectuar regularmente un control de calidad respecto a la sensibilidad y la especificidad de cada lote de reactivos de ELISA, utilizando el grupo de sueros de referencia proporcionado por el laboratorio comunitario de referencia. En este grupo se incluirán:

- sueros de cerdos en la fase inicial de infección por el virus de la PPA (antes de que hayan pasado 17 días desde la infección),
- sueros de cerdos convalecientes (después de que hayan pasado 17 días desde la infección).

La técnica ELISA utilizada para el diagnóstico serológico de la PPA debe detectar todos los sueros de referencia procedentes de cerdos convalecientes. Todos los resultados obtenidos con los sueros de referencia deben ser reproducibles. Se recomienda que también se detecten todos los sueros positivos de la fase inicial. Los resultados obtenidos con los sueros de referencia procedentes de cerdos en la fase inicial de la infección dan una indicación de la sensibilidad de la prueba ELISA.

4. La PIFI es una técnica rápida con un grado elevado de sensibilidad y de especificidad para la detección de anticuerpos de la PPA, tanto de sueros como de exudados de tejidos. Se basa en la detección de anticuerpos de la PPA que se unen a una monocapa de células MS infectadas con un virus adaptado de la PPA. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por medio de una proteína A marcada con fluoresceína. Las muestras positivas presentan fluorescencia específica cerca del núcleo de las células infectadas.

La combinación de las pruebas de IFD y de IFI para estudiar muestras de órganos, sangre y exudados, tomadas de animales que muestren signos clínicos de PPA, puede permitir la confirmación rápida y fiable de la enfermedad.

5. La prueba de inmunotransferencia es una técnica muy específica y sensible basada en el uso de tiras de nitrocelulosa que contiene proteínas víricas como antígeno. La reacción específica antígeno-anticuerpo se detecta mediante adición de un conjugado de proteína A con peroxidasa en presencia de un sustrato adecuado. Es muy útil someter a esta prueba los sueros que no den resultado claro en la prueba ELISA.

Capítulo VIII

Requisitos mínimos de seguridad de los laboratorios de PPA

1. Los requisitos contemplados en el cuadro 1 deberán cumplirse en cualquier laboratorio en que se amplifique el virus de la PPA por replicación en cultivos celulares. Sin embargo, las autopsias, el tratamiento de tejidos para la PFD o la RCP y la serología con antígeno inactivado podrán llevarse a cabo con un nivel inferior de contención, siempre que se cumplan los requisitos mínimos del cuadro 1, se aplique una higiene básica y se proceda a la desinfección tras las actividades, con la eliminación segura de los cuerpos, tejidos y sueros.

2. Los requisitos establecidos en el cuadro 2 deberán cumplirse en todos los laboratorios en que se inocule a animales el virus de la PPA.
3. Todas las existencias de virus de la PPA se mantendrán en lugar seguro, sea congeladas o liofilizadas. Cada una de las ampollas deberá estar rotulada claramente, y se llevarán registros completos de las existencias de virus junto con las fechas y resultados de las comprobaciones del control de calidad. Se llevarán asimismo registros de los virus añadidos a las existencias, con datos sobre su origen, y de los virus enviados a otros laboratorios.
4. Se recomienda que la unidad de bioseguridad para el trabajo con el virus de la PPA cuente con zonas auxiliares en que no se manipule este virus. Se deberá disponer de estas zonas para la preparación del material de vidrio y de los medios de cultivo, el mantenimiento y la preparación de cultivos celulares no infectados, el tratamiento de sueros y las pruebas serológicas (salvo las que utilicen virus vivos de la PPA), así como labores administrativas.

Cuadro 1

Principios de contención biológica apropiada para los laboratorios de diagnóstico

	Requisitos mínimos	Requisitos adicionales
Entorno general	Presión atmosférica normal. Salas especiales limitadas a procedimientos definidos.	Presión atmosférica normal. Filtración HEPA sencilla a la salida del aire. Salas especiales, utilizadas exclusivamente para el diagnóstico de la peste porcina clásica o de la PPA. Tratamiento térmico o químico de los efluentes potencialmente contaminados, para inactivar el virus de la PPA.
Vestimenta de laboratorio	Vestimenta exterior especial utilizada sólo en la unidad de virus de la PPA. Guantes desechables para todas las manipulaciones de material infectado. Vestimenta exterior esterilizada antes de sacarla de la unidad, o lavada a alta temperatura dentro de ella.	Cambio completo de ropa a la entrada. Vestimenta de laboratorio utilizada sólo en la unidad de virus de la PPA. Guantes desechables para todas las manipulaciones de material infectado. Vestimenta esterilizada antes de sacarla de la unidad, o lavada a alta temperatura dentro de ella.
Control del personal	Entrada a la unidad permitida sólo a personal designado y formado. Lavado y desinfección de manos al salir de la unidad. Prohibición de que el personal visite los locales de los cerdos durante las 48 horas siguientes a su salida de la unidad.	Entrada a la unidad permitida sólo a personal designado y formado. Lavado y desinfección de manos al salir de la unidad. Prohibición de que el personal visite los locales de los cerdos durante las 48 horas siguientes a su salida de la unidad.
Equipo	Cabina de seguridad biológica (clase I o II) utilizada para todas las manipulaciones de virus vivos. La cabina debe disponer de filtración HEPA doble a la salida del aire. Todo el equipo necesario para las actividades del laboratorio debe estar disponible en la zona especial del laboratorio.	

Cuadro 2

Requisitos de bioseguridad para los locales de los animales de laboratorio

	Requisitos
Entorno general	Ventilación controlada con presión negativa. Filtración HEPA sencilla a la salida del aire. Instalación de fumigación o descontaminación completa al final de la prueba. Tratamiento térmico o químico (incluida la incineración) de todos los efluentes con residuos sólidos y líquidos, para inactivar el virus de la PPA.

	Requisitos
Vestimenta de laboratorio	Cambio completo de ropa a la entrada. Vestimenta esterilizada antes de sacarla de la unidad, o lavada a alta temperatura dentro de ella.
Control del personal	Entrada a la unidad permitida sólo a personal designado y formado. Dejar la ropa dentro antes de ducharse. Ducha completa a la salida de la unidad. Prohibición de que el personal visite los locales de los cerdos durante las 48 horas siguientes a su salida de la unidad.
Equipo	Todo el equipo necesario para las actividades con animales debe estar disponible en la unidad. Todos los materiales deben esterilizarse al sacarlos de la unidad o, en caso de muestras de animales, ponerse con un doble envoltorio dentro de un envase estanco cuya superficie se desinfecte para el transporte al laboratorio de la PPA.
Animales	Todos los animales han de sacrificarse antes de salir de la unidad, las autopsias deben llevarse a cabo dentro de la zona de bioseguridad y los cuerpos han de incinerarse al término del examen.