

# COMISIÓN

## DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 4 de julio de 2000

**por la que se establecen procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación y diagnóstico diferencial de la enfermedad vesicular porcina**

[notificada con el número C(2000) 1805]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2000/428/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 92/119/CEE del Consejo, de 17 de diciembre de 1992, por la que se establecen medidas comunitarias generales para la lucha contra determinadas enfermedades de animales y medidas específicas respecto a la enfermedad vesicular porcina <sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia y, en particular, el apartado 3 de su anexo II,

Considerando lo siguiente:

(1) Es necesario establecer a nivel comunitario procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación de la enfermedad vesicular porcina y de rápida diferenciación respecto a la fiebre aftosa, con el objetivo de luchar mejor contra ambas enfermedades.

(2) En el anexo III de la Directiva 92/119/CEE se establecen las competencias y funciones del laboratorio comunitario de referencia para la enfermedad vesicular porcina a fin de coordinar, previa consulta con la Comisión, los métodos de diagnóstico de la enfermedad empleados en los Estados miembros. Entre estas competencias y funciones se incluyen la organización periódica de pruebas comparativas y la entrega de reactivos de referencia a nivel comunitario.

(3) Recientemente se han elaborado pruebas de laboratorio que permiten diagnosticar rápidamente la enfermedad vesicular porcina y distinguirla de la fiebre aftosa.

(4) Los resultados de las pruebas comparativas más recientes realizadas a nivel comunitario indican, especialmente, que se han elaborado pruebas fiables para detectar el antígeno o el genoma del virus de la enfermedad vesicular porcina y que estas pruebas pueden complementar satisfactoriamente la prueba de aislamiento del virus para el diagnóstico virológico de dicha enfermedad.

(5) La experiencia obtenida en la lucha contra la enfermedad vesicular porcina 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) Se han tenido en cuenta el dictamen y recomendaciones del Comité científico de la salud y bienestar de los animales en relación con la enfermedad vesicular porcina.

(7) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

### Artículo 1

1. Los Estados miembros velarán por que la confirmación de la enfermedad vesicular porcina y su diagnóstico diferencial respecto a la fiebre aftosa se basen en:

a) la detección de signos clínicos de la enfermedad;

<sup>(1)</sup> DO L 62 de 15.3.1993, p. 69.

- b) la detección del virus, su antígeno o su genoma en muestras de tejido epitelial, líquido vesicular o heces;
- c) la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos en muestras de suero,

de acuerdo con los procedimientos, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio establecidos en el Manual que figura anejo a la presente Decisión.

2. No obstante, los laboratorios nacionales de diagnóstico recogidos en el punto 5 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE podrán introducir modificaciones en las pruebas de laboratorio contempladas en el Manual que figura anejo a la presente Decisión o utilizar pruebas diferentes, siempre que pueda demostrarse que su sensibilidad y su especificidad son equivalentes.

La sensibilidad y la especificidad de estas pruebas modificadas o diferentes deberán evaluarse en el contexto de las pruebas

comparativas periódicas organizadas por el laboratorio comunitario de referencia para la enfermedad vesicular porcina.

*Artículo 2*

La presente Decisión será aplicable a partir del 1 de octubre de 2000.

*Artículo 3*

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 4 de julio de 2000.

*Por la Comisión*

David BYRNE

*Miembro de la Comisión*

## ANEXO

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO, MÉTODOS DE MUESTREO Y CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO CON FINES DE CONFIRMACIÓN Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA**

## CAPÍTULO I

***Introducción, objetivos y definiciones***

1. El presente Manual:
  - a) proporciona directrices y condiciones mínimas en relación con los procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con vistas al diagnóstico correcto de la enfermedad vesicular porcina; no obstante, se insiste especialmente también en el diagnóstico diferencial respecto a la fiebre aftosa;
  - b) integra las disposiciones del anexo II de la Directiva 92/119/CEE y en especial de sus puntos 4, 7 y 8;
  - c) se dirige principalmente a las autoridades encargadas de la lucha contra la enfermedad vesicular porcina; por tanto, insiste en los principios y aplicaciones de las pruebas de laboratorio y en la evaluación de sus resultados, y no en el detalle de las técnicas de laboratorio.
2. A efectos del presente Manual, se considera:
  - a) «cerdo seropositivo»: todo cerdo cuyo suero, en la prueba de neutralización del virus utilizada por el laboratorio nacional, tenga un título de anticuerpos igual o superior al suero de referencia de la enfermedad vesicular porcina nº 4 citado en el capítulo X;
  - b) «animal positivo aislado»: todo cerdo seropositivo único en una explotación que dé resultado positivo en pruebas serológicas de la enfermedad vesicular porcina pero sin tener antecedentes de contacto con el virus de la enfermedad vesicular porcina y a partir del cual no hay señales de propagación de la infección a cerdos en contacto con él; se confirma que un cerdo seropositivo es un animal positivo aislado si se cumplen las condiciones contempladas en la parte C del capítulo VIII;
  - c) «cerdos en contacto»: todos los cerdos que estén o hayan estado en contacto directo en los últimos 28 días, con uno o más cerdos seropositivos o con uno o más cerdos sospechosos de estar infectados con el virus de la enfermedad vesicular porcina; los cerdos en contacto podrán estar o haber estado en la misma pocilga o en pocilgas adyacentes si es posible el contacto entre cerdos de distintas pocilgas.

## CAPÍTULO II

***Directrices sobre la inspección de cerdos con signos clínicos de enfermedad vesicular porcina***

1. Los Estados miembros velarán por que, cuando se sospeche la presencia del virus de la enfermedad vesicular porcina en una explotación, el veterinario oficial inspeccione lo antes posible un número estadísticamente significativo de cerdos a fin de detectar los signos clínicos de la enfermedad descritos en el capítulo IX.
2. Los Estados miembros velarán por que, cuando haya cerdos con signos clínicos indicadores de enfermedad vesicular porcina o de fiebre aftosa, se realice lo antes posible un diagnóstico diferencial mediante un muestreo y unas pruebas de laboratorio que sean apropiados, de acuerdo con las disposiciones contempladas en los capítulos IV, VII y VIII del presente Manual.

## CAPÍTULO III

***Procedimientos generales para el muestreo y el transporte de muestras***

1. Toda persona que entre en una explotación en la que se sospeche la presencia de enfermedad vesicular porcina (o salga de ella) debe observar las medidas higiénicas más estrictas que sean necesarias para reducir el riesgo de contaminación o propagación del virus.
2. Todos los cerdos utilizados para el muestreo deben marcarse inconfundiblemente de forma que puedan identificarse en caso de un nuevo muestreo. Se recomienda que, junto con la marca inconfundible de identificación, se registre la ubicación de cada cerdo utilizado en el muestreo, especialmente en caso de que se utilicen cerdos sospechosos.
3. Las muestras deben enviarse al laboratorio acompañadas por la documentación apropiada, que contendrá datos de los antecedentes de los cerdos utilizados y los eventuales signos clínicos observados.
4. Dado que cualquier afección vesicular de los cerdos puede ser fiebre aftosa, deben tomarse precauciones especiales para que las muestras sospechosas se envasen de forma segura. Estas precauciones deben tener el objetivo principal de evitar la rotura o las fugas de los envases y el riesgo de contaminación, pero también es importante garantizar que las muestras lleguen en un estado satisfactorio. Si se pone hielo dentro de un envase, debe evitarse la salida del agua. Ningún envase con muestras sospechosas de contener virus de la enfermedad vesicular porcina debe abrirse desde el momento en que salga de las instalaciones infectadas hasta que llegue al laboratorio.

5. Las muestras sospechosas de contener virus de la enfermedad vesicular porcina sólo pueden analizarse en un laboratorio autorizado para manipular el virus de la fiebre aftosa con fines de diagnóstico, de acuerdo con la legislación comunitaria sobre lucha contra la fiebre aftosa, salvo que se haya descartado previamente la presencia de fiebre aftosa.
6. Todas las muestras pueden transportarse a 4 °C si se espera que el tiempo de transporte hasta el laboratorio destinatario sea inferior a 48 horas; en caso contrario, deben mantenerse a una temperatura que no sobrepase los - 20 °C.
7. Para las muestras destinadas al laboratorio comunitario de referencia que procedan de Estados miembros distintos del Reino Unido, el único modo de transporte permitido es por avión al aeropuerto de Londres-Heathrow o al de Londres-Gatwick. Antes de realizar el envío hay que comunicar al laboratorio por fax [(44) 1483-232621] o correo electrónico los datos del vuelo, fecha, hora prevista de llegada y número de remesa, de forma que se pueda localizar el paquete en cuanto llegue. El paquete debe estar dirigido a:

Institute for Animal Health  
 Pirbright Laboratory Community Reference Laboratory for swine vesicular disease  
 Ash Road, Pirbright, Woking  
 Surrey GU24 0NF  
 Inglaterra, Reino Unido

Debe figurar también en la etiqueta la información siguiente: «Animal Pathological Material of no commercial value. Perishable. Fragile. To be collected at airport by addressee. Not to be opened outside the laboratory».

La recogida autorizada de los envíos se hará en el aeropuerto por personal del laboratorio comunitario de referencia, acogiendo a un certificado de importación general especial, expedido a este efecto por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Pesca del Reino Unido. Al tratarse de una medida permanente, no es necesario un certificado aparte para cada importación. Está prohibida la introducción a mano en el Reino Unido de material vesicular sospechoso por personal no autorizado. No deben utilizarse empresas de mensajería.

8. El transporte de muestras a los laboratorios nacionales debe ajustarse a las instrucciones elaboradas por las autoridades competentes de los Estados miembros.

#### CAPÍTULO IV

##### *Procedimientos de muestreo en explotaciones con cerdos sospechosos clínicamente*

1. Cuando se sospeche la presencia del virus de la enfermedad vesicular porcina en una explotación por haberse observado signos clínicos de la enfermedad, deberán tomarse muestras adecuadas de los grupos representativos de cerdos que muestren tales signos para confirmar la enfermedad y establecer el diagnóstico diferencial respecto a la fiebre aftosa.
2. En estas explotaciones, las mejores muestras para el diagnóstico son el epitelio y el líquido vesicular de vesículas sin reventar o recién reventadas, tomadas de cerdos que presenten los signos típicos de la enfermedad, en las que pueda detectarse el virus de la enfermedad vesicular porcina, sus antígenos o su genoma. Se recomienda tomar muestras de unos cinco o seis de estos cerdos.
3. Aun cuando se disponga de líquido vesicular y de tejido epitelial fresco en cantidad suficiente (1 g o más), deben tomarse también las muestras siguientes:
  - a) muestras de sangre de los cerdos sospechosos y de cerdos en contacto para las pruebas serológicas; y
  - b) muestras de heces de cerdos sospechosos y del suelo de su pocilga y de las pocilgas adyacentes para las pruebas virológicas.
4. Las muestras deben tomarse y transportarse de acuerdo con los procedimientos siguientes:
  - a) muestras de epitelio y de líquido vesicular:
    - si es posible, debe tomarse al menos 1 g de tejido epitelial de vesículas sin reventar o recién reventadas; se recomienda sedar a los cerdos antes de tomar las muestras, tanto para evitar lesiones al personal como por el bienestar de los cerdos,
    - si el transporte al laboratorio nacional se realiza inmediatamente (en menos de tres horas), las muestras epiteliales pueden transportarse en seco y mantenerse refrigeradas; no obstante, si es probable que el tiempo supere las tres horas, habrá que poner las muestras en un pequeño volumen de medio de transporte formado por partes iguales de glicerol y solución amortiguadora de fosfato 0,04 M u otra solución amortiguadora equivalente (HEPES), de forma que el pH se mantenga en la banda óptima para la supervivencia del virus de la fiebre aftosa (entre 7,2 y 7,6); el medio de transporte debe contener antibióticos que aporten actividad antimicrobiana; pueden indicarse como adecuados los siguientes antibióticos con su concentración final por ml:
      - i) penicilina 1 000 UI,
      - ii) sulfato de neomicina 100 UI,
      - iii) sulfato de polimixina B 50 UI,
      - iv) micostatina 100 UI,
    - si puede tomarse líquido vesicular de una vesícula sin reventar, deberá conservarse sin diluir en un recipiente aparte;

- b) muestras de sangre:
- pueden tomarse para las pruebas serológicas o virológicas; no obstante, se toman generalmente sólo de cerdos sospechosos de haberse recuperado de una infección clínica o subclínica con fines de detección de los anticuerpos, ya que las muestras de epitelio, líquido vesicular y heces procedentes de cerdos con signos clínicos de enfermedad son mejores que las muestras de sangre para la detección del virus; se recomienda tomar muestras de sangre total mediante tubos con vacío (vacutainer) sin anticoagulante y que éstos se transporten sin abrir;
- c) muestras de heces:
- las muestras de heces del suelo de las instalaciones sospechosas de contener o de haber contenido cerdos infectados con la enfermedad vesicular porcina, o los hisopos fecales y muestras de heces de cerdos vivos sospechosos, deben colocarse en recipientes resistentes y herméticamente cerrados.

Los recipientes de muestras sospechosas deben desinfectarse en su exterior antes de transportarse al laboratorio. Los siguientes desinfectantes son adecuados:

- hidróxido sódico (dilución 1:100),
- formol (dilución 1:9 de una solución de formol con un mínimo del 34 % de formaldehído), y
- hipoclorito sódico (2 % de cloro disponible).

Estos desinfectantes deben manejarse con cuidado.

## CAPÍTULO V

### ***Procedimientos de muestreo con fines de vigilancia serológica de la enfermedad vesicular porcina***

1. Cuando se vaya a realizar vigilancia serológica de los tipos siguientes:
  - a) vigilancia de explotaciones en las que no haya pruebas ni sospecha de presencia de la enfermedad;
  - b) vigilancia de mataderos, mercados, centros de recogida o lugares similares mediante muestreo serológico sistemático;
  - c) vigilancia no discriminatoria de cerdos procedentes de otros Estados miembros en la explotación importadora, deberán tomarse muestras de sangre de los cerdos para las pruebas serológicas de acuerdo con las disposiciones de los planes o programas de seguimiento o erradicación aprobados en el ámbito de la Decisión 90/424/CEE del Consejo <sup>(1)</sup> o de la Directiva 90/425/CEE del Consejo <sup>(2)</sup> o bien, a falta de tales disposiciones, de acuerdo con los procedimientos establecidos por las autoridades competentes de los Estados miembros.
2. Cuando se vaya a realizar vigilancia serológica de los tipos siguientes:
  - a) vigilancia de explotaciones situadas dentro de las zonas de protección y vigilancia que se hayan establecido previa confirmación de brotes de la enfermedad de acuerdo con los puntos 7 y 8 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE, o
  - b) vigilancia de las explotaciones contempladas en el artículo 9 de la Directiva 92/119/CEE del Consejo, deberán tomarse muestras de sangre de los cerdos para las pruebas serológicas de acuerdo con las normas siguientes:
    - en caso de explotaciones de cría, deberán aplicarse procedimientos aleatorizados de muestreo de forma que se detecte una prevalencia del 5 % de seroconversión con una confianza del 95 %,
    - en caso de explotaciones que tengan sólo cerdos de engorde, el procedimiento de muestreo deberá garantizar que el número total de muestras tomadas es igual al menos al número necesario para detectar una prevalencia del 5 % con una confianza del 95 %, en cualquier caso, las muestras deben tomarse del mayor número posible de pocilgas seleccionadas aleatoriamente,
    - en caso de explotaciones mixtas de cría y de engorde, cada grupo de cerdos alojados en locales separados deberá someterse a un muestreo de forma que se detecte una prevalencia del 5 % de seroconversión con una confianza del 95 %.

## CAPÍTULO VI

### ***Medidas adicionales y procedimientos de nuevo muestreo en caso de detección de cerdos seropositivos***

1. En caso de que en una explotación se detecte un único cerdo seropositivo como consecuencia de la vigilancia contemplada en la letra a) del punto 1 o en el punto 2 del capítulo V, la autoridad competente velará por que:
  - a) se apliquen en esa explotación las medidas contempladas en el artículo 4 de la Directiva 92/119/CEE, si aún no se hubieran aplicado;
  - b) se realice la inspección de la explotación de acuerdo con las disposiciones contempladas en el punto 1 del capítulo II;

<sup>(1)</sup> DO L 224 de 18.8.1990, p. 19.

<sup>(2)</sup> DO L 224 de 18.8.1990, p. 29.

- c) se tomen muestras de sangre para las pruebas serológicas a partir:
- del cerdo sospechoso,
  - de cerdos en contacto que estén en la misma pocilga que el cerdo sospechoso y en las adyacentes; estos cerdos deberán someterse a un muestreo de forma que se detecte en la pocilga una prevalencia del 50 % de seroconversión con una confianza del 95 %.
2. No obstante, la autoridad competente podrá decidir la suspensión de las medidas contempladas en la letra a) del punto 1 si:
- a) la investigación epidemiológica realizada de acuerdo con el artículo 8 de la Directiva 92/119/CEE indica que no se ha introducido en la explotación la enfermedad vesicular porcina;
  - b) no se ha detectado en la explotación ningún signo clínico de enfermedad vesicular porcina, y
  - c) la explotación no se encuentra en una zona de vigilancia o restricción establecida tras un brote confirmado de enfermedad ni está sujeta a otras restricciones aplicadas en relación con un brote confirmado de enfermedad, y siempre que se cumplan las condiciones siguientes:
    - que no salga ningún cerdo de la explotación para el comercio intracomunitario, y
    - que los cerdos de la explotación correspondiente no salgan mas que para ir a un matadero para su sacrificio inmediato o a otra explotación de la que no salga ningún cerdo para el comercio intracomunitario,hasta que los resultados de las inspecciones y pruebas serológicas adicionales indiquen que puede descartarse definitivamente la presencia de enfermedad vesicular porcina.
3. Si las inspecciones y las pruebas serológicas realizadas de acuerdo con las letras b) y c) del apartado 1 anterior:
- a) dan resultados negativos o sólo se confirma como positivo el cerdo anteriormente positivo (animal positivo aislado), puede descartarse la presencia de enfermedad vesicular porcina; las medidas contempladas en la letra a) del apartado 1 quedarán en suspenso, salvo que la explotación se encuentre en una zona de protección o vigilancia establecida alrededor de un brote de enfermedad donde deban seguir vigentes las medidas de erradicación de la enfermedad de acuerdo con los puntos 7 u 8 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE;
  - b) indican que se encuentra en la explotación más de un cerdo seropositivo, habrá que confirmar la presencia de enfermedad vesicular porcina o bien, si no se cumplen las condiciones establecidas en el punto 4 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE para confirmar la presencia de esta enfermedad, habrá que tomar muestras adicionales de la explotación de acuerdo con los procedimientos de muestreo contemplados en el punto 4.
4. En caso de que en una explotación se detecte más de un cerdo seropositivo como consecuencia del muestreo y las pruebas serológicas contempladas en las letras a) o c) del punto 1 o en el punto 2 del capítulo V, sin que se cumplan las condiciones establecidas en el punto 4 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE para confirmar la presencia de la enfermedad vesicular porcina, la autoridad competente velará por:
- a) que se apliquen o sigan aplicándose las medidas contempladas en el artículo 4 de la Directiva 92/119/CEE;
  - b) que se realice una inspección de la explotación de acuerdo con las disposiciones contempladas en el punto 1 del capítulo II;
  - c) que se tomen para las pruebas serológicas muestras adicionales de sangre de los cerdos seropositivos y de cerdos en contacto de acuerdo con la letra c) del punto 1;
  - d) que se tomen para las pruebas serológicas muestras de sangre de cerdos alojados en los demás edificios de la explotación de acuerdo con el procedimiento contemplado en el punto 2 del capítulo V;
  - e) que se tome un número suficiente de muestras fecales para realizar pruebas virológicas a partir:
    - de los cerdos seropositivos,
    - del suelo de las pocilgas en que se encuentren cerdos seropositivos y de las pocilgas adyacentes,
    - de pocilgas seleccionadas aleatoriamente de otros edificios de la explotación.

Las muestras fecales tomadas de acuerdo con los anteriores guiones primero y segundo deberán examinarse lo antes posible. En caso de que estas muestras sean negativas pero los resultados de las pruebas serológicas indiquen que el virus de la enfermedad vesicular porcina podría haberse propagado a otros edificios, deberán examinarse también las muestras fecales tomadas de acuerdo con el anterior guión tercero.

Si, una vez realizados estas inspecciones y pruebas adicionales, no se cumplen las condiciones establecidas en el punto 4 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE para confirmar la presencia de la enfermedad vesicular porcina, los cerdos seropositivos serán matados o sacrificados de acuerdo con las disposiciones contempladas en la letra d) del punto 4 del anexo II de la Directiva 92/119/CEE. No obstante, si se observa que son seropositivos otros cerdos distintos de los que ya se habían detectado como consecuencia del muestreo anterior, además se aplicarán *mutatis mutandis* las disposiciones y procedimientos contemplados en las anteriores letras a), b), c), d) y e).

5. No obstante las medidas contempladas en el artículo 9 de la Directiva 92/119/CEE, en caso de que se detecte uno o más cerdos seropositivos como consecuencia de las actividades de vigilancia contempladas en las letras b) o c) del punto 1 del capítulo V, la autoridad competente velará por:
- que, cuando sea necesario y factible, se realicen las inspecciones adicionales adecuadas, incluida la toma de muestras, para confirmar o descartar la presencia de enfermedad vesicular porcina en el lugar en que se hayan detectado estos cerdos, teniendo en cuenta la situación local;
  - que se apliquen en la explotación de origen de estos cerdos las medidas contempladas en el artículo 4 de la Directiva 92/119/CEE;
  - que se realice una inspección de la explotación de origen de estos cerdos en conformidad con las disposiciones contempladas en el punto 1 del capítulo II; y
  - que se tomen para las pruebas serológicas muestras de sangre de los cerdos de la explotación de origen de los cerdos seropositivos, de acuerdo con las disposiciones contempladas en el punto 2 del capítulo V.
6. No obstante, la autoridad competente podrá decidir la suspensión de las medidas contempladas en la letra b) del punto 5 si:
- la investigación epidemiológica realizada de acuerdo con los artículos 4 y 8 de la Directiva 92/119/CEE indica que no se ha introducido en la explotación la enfermedad vesicular porcina;
  - se ha detectado en la explotación ningún signo clínico de enfermedad vesicular porcina;
  - la explotación no se encuentra en una zona de vigilancia o restricción establecida tras un brote confirmado de enfermedad ni está sujeta a otras restricciones aplicadas en relación con un brote confirmado de enfermedad, y siempre que se cumplan las condiciones siguientes:
    - que no salga ningún cerdo de la explotación para el comercio intracomunitario, y
    - que los cerdos no salgan de la explotación mas que para ir a un matadero para su sacrificio inmediato o a otra explotación de la que no salga ningún cerdo para el comercio intracomunitario,hasta que los resultados de las inspecciones y pruebas serológicas adicionales realizadas en el lugar en que se habían detectado los cerdos seropositivos y en su explotación de origen indiquen que puede descartarse definitivamente la presencia de enfermedad vesicular porcina.

## CAPÍTULO VII

### *Principios y aplicaciones de las pruebas virológicas y evaluación de sus resultados*

#### **A. Detección del antígeno vírico**

- Una prueba ELISA indirecta de emparedado ha sustituido a la prueba de fijación del complemento como método recomendado para la detección del antígeno del virus de la enfermedad vesicular porcina. La prueba es la misma que se utiliza para el diagnóstico de la fiebre aftosa. Deben realizarse a la vez las pruebas de las dos enfermedades, salvo que se haya descartado previamente la presencia de fiebre aftosa. Se recomienda en particular trabajar con muestras de epitelio o de líquido de lesiones vesiculares, donde pueden estar presentes en alta concentración los virus tanto de la enfermedad vesicular porcina como de la fiebre aftosa en caso de infección aguda y es posible detectarlos ahí en el plazo de unas horas <sup>(3)</sup>.

El antisuero de conejo contra el virus de la enfermedad vesicular porcina y contra cada uno de los siete serotipos del virus de la fiebre aftosa se utiliza para recubrir unas filas duplicadas de placas de pocillos de ELISA. Estos son los sueros atrapadores. A cada una de las filas se añaden suspensiones de la muestra problema, con inclusión de los controles adecuados. Se añade suero homólogo de detección de cobaya a las filas respectivas en la siguiente fase, seguida por la adición de suero de conejo anticobaya conjugado con una enzima como la peroxidasa de rábano silvestre. Entre cada dos fases se hace un lavado a fondo para eliminar los reactivos que no se hayan unido. La reacción positiva se manifiesta si aparece color tras la adición de un cromógeno y de un sustrato. Con una reacción fuertemente positiva este color se aprecia a simple vista, pero los resultados pueden leerse por espectrofotometría, en cuyo caso una lectura de absorbancia de 0,1 por encima del nivel de fondo indica reacción positiva.

- Es posible utilizar otros sistemas alternativos de ELISA a base de anticuerpos monoclonales, con anticuerpos monoclonales seleccionados como anticuerpo atrapador y anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa como anticuerpo detector, con fines de detección del antígeno de la enfermedad vesicular porcina y de diagnóstico diferencial respecto a la fiebre aftosa en muestras de epitelio, líquido vesicular o cultivos tisulares infectados.
- Puede utilizarse una prueba ELISA a base de anticuerpos monoclonales para estudiar la variación antigénica entre cepas del virus de la enfermedad vesicular porcina. Los antígenos obtenidos en cultivos tisulares son atrapados por un antisuero hiperinmune de conejo contra la enfermedad vesicular porcina adsorbido en la fase sólida. Se hacen reaccionar entonces grupos adecuados de anticuerpos monoclonales y se compara la unión de anticuerpos monoclonales contra cepas de campo respecto a la unión de anticuerpos monoclonales contra las cepas parentales. Una unión similar indica la presencia de epitopos compartidos entre las cepas parentales y de campo.

<sup>(3)</sup> Unos resultados positivos con ELISA se asocian con la presencia de al menos  $10^5$  DICT<sub>50</sub> (dosis infecciosas de cultivo tisular) del virus en la muestra.

## B. Aislamiento y cultivo del virus

1. De forma sistemática hay que realizar la inoculación en cultivos celulares sensibles de suspensiones clarificadas de muestras de epitelio, líquido vesicular o heces sospechosas de contener el virus de la enfermedad vesicular porcina. Si la cantidad y calidad de las muestras procedentes de lesiones vesiculares presentadas a examen es insuficiente para su estudio inmediato por ELISA, será necesario amplificar el antígeno vírico mediante siembra del virus en cultivos tisulares.
2. Para aislar y cultivar el virus, se inocula la suspensión epitelial clarificada en la superficie de cultivos monocapa de células IB-RS-2. Deben utilizarse dos diluciones de suspensión epitelial, una alta (1/500) y otra baja (1/10), a fin de evitar interferencias con el interferón, cuya liberación interferiría con el cultivo del virus de la enfermedad vesicular porcina. Para el aislamiento del virus se añaden al medio de cultivo sólo antibióticos. Para el diagnóstico diferencial respecto al virus de la fiebre aftosa, deben inocularse también células primarias de tiroides de bovino, o células renales de hámster recién nacido (BHK-21).
3. Si aparece algún efecto citopático, deberá recogerse el líquido sobrenadante de cultivos positivos cuando el efecto sea completo, para utilizarlo en la prueba ELISA de identificación del virus. Los cultivos negativos deben inocularse en cultivos tisulares frescos a las 48 o 72 horas, y este pase ciego debe examinarse hasta 72 horas después. En ausencia de efectos citopáticos tras un pase ciego adicional, la muestra podrá declararse negativa respecto a la presencia de virus vivos.
4. Las suspensiones de muestras fecales pueden tratarse de la forma descrita en el punto 1. Como normalmente hay menos virus en las heces que en el epitelio, es fundamental que, en caso de ausencia de efecto citopático en los dos primeros pases, se incluya un tercer pase ciego.
5. La inoculación simultánea en una línea celular porcina y en uno de los sistemas antes mencionados de cultivo tisular (preferentemente, células primarias de tiroides de bovino) es útil para determinar si las muestras de vesículas contienen el virus de la enfermedad vesicular porcina o el virus de la fiebre aftosa, ya que aquel sólo crece en las células de origen porcino. No obstante, las cepas de virus de la fiebre aftosa que hayan experimentado muchas transmisiones entre cerdos pueden crecer también preferentemente en sistemas de cultivos celulares porcinos.

## C. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la detección del genoma

1. Pueden aplicarse métodos de reconocimiento de ácido nucleico para detectar el genoma del virus de la enfermedad vesicular porcina en material clínico utilizando la RCP y para establecer relaciones entre cepas de este virus determinando la secuencia nucleotídica de parte del genoma. Se han desarrollado técnicas que utilizan la RCP para mejorar la sensibilidad del diagnóstico. Se han descrito procedimientos ligeramente diferentes de RCP con transcriptasa inversa que utilizan cebadores correspondientes a regiones muy conservadas en los genes 1C y 1D.
2. La técnica de la RCP es rápida (generalmente se obtienen resultados en el plazo de 24 horas), detecta todos los genotipos del virus de la enfermedad vesicular porcina y es suficientemente sensible para utilizarse con muestras tomadas en casos de sospecha de enfermedad clínica.
3. Cuando se sospeche la presencia de infección subclínica, cuando se tomen muestras después de la resolución de la enfermedad clínica o cuando se traten muestras fecales, las técnicas mejoradas de RCP-TI, como la RCP-TI en fases sucesivas (nested, RCP-II), RCP inmunológica, ELISA-RCP y métodos más elaborados de extracción de ARN conforman un sistema de detección al menos tan sensible como los pases múltiples por cultivos tisulares pero considerablemente más rápido.
4. Mediante la secuenciación de unos 200 nucleótidos dentro del gen 1D que codifica la importante proteína estructural VP1, es posible agrupar cepas del virus de la enfermedad vesicular porcina en función de la homología de sus secuencias, y cepas epidemiológicamente relacionadas causantes de la enfermedad en regiones diferentes o en momentos distintos.

## D. Evaluación de los resultados de las pruebas virológicas

La detección de antígenos o del genoma del virus de la enfermedad vesicular porcina mediante ELISA y RCP tiene el mismo valor diagnóstico que el aislamiento del virus.

No obstante, debe considerarse que el aislamiento del virus es la prueba de referencia y debe utilizarse como prueba de confirmación cuando sea necesario, especialmente si el resultado positivo con ELISA o RCP no está asociado con:

- a) la detección de signos clínicos de la enfermedad;
- b) la detección de cerdos seropositivos; o
- c) una conexión epidemiológica directa respecto a un brote confirmado.



## CAPÍTULO VIII

**Principios y aplicaciones de las pruebas serológicas y evaluación de sus resultados****A. Prueba de neutralización del virus (NV)**

1. La microprueba cuantitativa de NV para la detección del anticuerpo del virus de la enfermedad vesicular porcina se lleva a cabo con células IB-RS-2 o un sistema celular equivalente en placas de microtitulación de fondo plano para cultivos tisulares.
2. El virus se cultiva en monocapas de células IB-RS-2 y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  tras la adición de 50 % de glicerol o a  $-70^{\circ}\text{C}$  sin glicerol. Los sueros se inactivan a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos antes de la prueba.

**B. ELISA**

1. La prueba ELISA para la detección de anticuerpos es una ELISA competitiva a base de anticuerpos monoclonales. Si la muestra de suero contiene anticuerpos contra el virus de la enfermedad vesicular porcina, quedará inhibida la unión de un anticuerpo monoclonal, contra el antígeno vírico, seleccionado y conjugado con peroxidasa.

En esta prueba ELISA, el antígeno del virus de la enfermedad vesicular porcina queda atrapado en la fase sólida por el uso de anticuerpos monoclonales; después, las muestras de suero se incuban a la dilución adecuada y a continuación se les añade el anticuerpo monoclonal conjugado con la peroxidasa. Luego se mide la inhibición de la unión al anticuerpo monoclonal mediante un sustrato y un cromógeno.

2. Para evaluar el momento de la infección en el cerdo o en el local infectado es útil una prueba ELISA de atrapado indirecto con utilización de anticuerpos monoclonales con especificidad de isotipo a fin de detectar las IgG o IgM de cerdo específicas del virus de la enfermedad vesicular porcina.

En la prueba ELISA con especificidad de isotipo, el antígeno del virus queda atrapado en la fase sólida por el uso de anticuerpos que capturan el antígeno. Si la muestra de suero contiene anticuerpos contra el virus de la enfermedad vesicular porcina, se detectan mediante un anticuerpo monoclonal contra IgG de cerdo o contra IgM de cerdo, conjugado con peroxidasa. Luego, esta unión se mide mediante un sustrato y cromógeno.

La prueba ELISA con especificidad de isotipo puede ayudar también a distinguir animales positivos aislados frente a cerdos realmente positivos, como se indica en la parte C.

**C. Aplicación de las pruebas serológicas y evaluación de los resultados**

1. Las pruebas serológicas recomendadas son la de NV y la ELISA. El capítulo X recoge los sueros de referencia, que pueden obtenerse del laboratorio comunitario de referencia para que se realicen en la Comunidad pruebas serológicas normalizadas.

Debe considerarse que la prueba de NV es la de referencia, pero tiene el inconveniente de que necesita entre dos y tres días para completarse, así como instalaciones de cultivo tisular.

La prueba ELISA es más rápida y puede normalizarse más fácilmente. La prueba ELISA de competencia de anticuerpos monoclonales es la prueba ELISA más fiable descrita hasta la fecha en relación con los anticuerpos contra la enfermedad vesicular porcina. Se recomienda como prueba de preselección con un gran número de muestras.

No obstante, la prueba de NV debe utilizarse como prueba de confirmación cuando sea necesario, especialmente tras una primera detección de muestras positivas en una explotación. Pueden ignorarse los cerdos que den resultado positivo con ELISA pero negativo con la prueba de NV.

2. Puede sospecharse la presencia de un animal positivo aislado (\*) cuando se detecte un único cerdo seropositivo y se cumplan los criterios siguientes:
  - a) no hay signos clínicos de enfermedad en la explotación;
  - b) no hay antecedentes relevantes de enfermedad clínica en la explotación;
  - c) no hay antecedentes de contacto con un brote conocido de enfermedad.
3. Se considera confirmado que un cerdo es un animal positivo aislado cuando:
  - a) las pruebas posteriores no detectan otros cerdos seropositivos;
  - b) las muestras tomadas de cerdos en contacto tras la primera detección del animal positivo aislado no permiten detectar ninguna seroconversión;
  - c) el título de anticuerpos al repetir los muestreos permanece constante o disminuye.

(\*) Puede detectarse una pequeña proporción de animales positivos aislados mediante cualquiera de las pruebas serológicas habituales de la enfermedad vesicular porcina. No se conocen los factores de la presencia de animales positivos aislados. La reactividad serológica cruzada con el virus de la enfermedad vesicular porcina podría deberse a la infección con algún picornavirus aún no identificado, o a otros factores inespecíficos presentes en el suero.

4. No obstante, deben considerarse también los siguientes principios y criterios adicionales para la confirmación de un animal positivo aislado:
- los animales positivos aislados aparecen con una frecuencia aproximada de 1 por 1 000 cerdos;
  - los sueros de animales positivos aislados tienen generalmente el perfil siguiente:
    - bajo título de anticuerpos en la prueba de NV,
    - positividad en el límite con la prueba ELISA de competencia a base de anticuerpos monoclonales,
    - presencia exclusiva de IgM y no de IgG en la prueba ELISA <sup>(5)</sup> con especificidad de isotipo de la enfermedad vesicular porcina.

## CAPÍTULO IX

### *Signos clínicos y características de la enfermedad vesicular porcina*

La enfermedad vesicular porcina es una enfermedad contagiosa de los cerdos causada por un enterovirus de la familia *Picornaviridae* y puede adoptar la forma de una afección vesicular subclínica, leve o grave, en función de la cepa del virus responsable, la vía y la dosis de infección, así como de las condiciones zootécnicas de los cerdos. Otros factores adicionales de tensión, como el transporte, la mezcla con otros cerdos y temperaturas extremas podrían predisponer asimismo al desarrollo de signos clínicos.

Se caracteriza por fiebre suave y aparición de vesículas en la rosca de la pezuña, los bulbos del talón, la piel de los miembros y, con menor frecuencia, el hocico, los labios, la lengua y las tetillas. La tasa de morbilidad puede llegar al 100 % pero la mortalidad es muy baja o nula.

La infección puede tomar una forma inaparente o leve, con tan sólo un deterioro transitorio del estado general de los cerdos, pero que induce la formación de anticuerpos neutralizantes del virus en el plazo de unos días <sup>(6)</sup>.

Debido a la naturaleza subclínica o leve de la enfermedad, es frecuente tener la primera sospecha como consecuencia de pruebas serológicas para la vigilancia de la enfermedad o para un certificado de exportación. Los recientes brotes europeos de enfermedad vesicular porcina se han caracterizado por signos clínicos leves o por ausencia de signos, de forma que el diagnóstico se basa con frecuencia en la serología.

No obstante, los signos clínicos de la enfermedad vesicular porcina son indistinguibles de los de la fiebre aftosa. Toda afección vesicular debe tratarse en principio como sospecha de fiebre aftosa y debe obtenerse un diagnóstico diferencial lo antes posible.

El período de incubación de la enfermedad vesicular porcina en cada cerdo dura generalmente entre dos y siete días, tras el cual puede haber una fiebre transitoria de hasta 41 °C, pero los signos clínicos se hacen visibles en la explotación tras un plazo mayor. Pueden aparecer entonces vesículas en la rosca de la pezuña, típicamente en la unión con el talón. Pueden afectar a toda la rosca, lo que ocasiona la pérdida de la pezuña. Con menor frecuencia, es posible que aparezcan vesículas también en el hocico, sobre todo en la superficie dorsal, en los labios, lengua y tetillas, y pueden verse erosiones poco profundas en las rodillas. Los cerdos afectados pueden estar cojos e inapetentes durante unos días.

Los cerdos más jóvenes se ven más afectados, aunque es muy rara la mortalidad debida a la enfermedad vesicular porcina, a diferencia de la fiebre aftosa en el ganado joven.

Se han comunicado signos neurológicos, pero son raros. El aborto no es un signo típico de la enfermedad vesicular porcina. La insuficiencia cardíaca debida a una miocardiosis multifocal puede ser un signo de fiebre aftosa y encefalomiocarditis, especialmente en pequeños lechones, pero no se da en la enfermedad vesicular porcina.

La recuperación suele ser completa a las dos o tres semanas, y como única señal de la infección queda una línea oscura y horizontal en la pezuña, en el lugar donde se ha interrumpido temporalmente el crecimiento.

Los cerdos afectados pueden excretar virus por la nariz y la boca y en las heces hasta 48 horas antes del inicio de los signos clínicos. La mayoría de los virus se producen en los primeros siete días después de la infección, y la excreción de virus por la nariz y la boca suele acabar en el plazo de dos semanas. Es posible aislar virus de las heces hasta 20 días después de la infección, aunque se ha indicado que pueden estar presentes en ellas hasta tres meses. Pueden persistir durante un considerable período de tiempo en el tejido necrótico asociado a las vesículas reventadas y en las heces.

<sup>(5)</sup> Generalmente se detecta IgG específica sola o junto con IgM en las muestras de suero procedentes de cerdos infectados con el virus de la enfermedad vesicular porcina, mientras que los sueros de animales positivos aislados contienen normalmente sólo IgM. No se detecta IgG específica en las muestras de suero de los cerdos infectados con el virus de la enfermedad vesicular porcina durante los 10-14 días anteriores, aunque sí debe encontrarse IgG específica en una segunda muestra de sangre. No obstante, los cerdos recién infectados no pueden distinguirse con seguridad de los animales positivos aislados antes de que su respuesta inmunitaria cambie de la producción de IgM a la de IgG. Véase también el capítulo IX y la nota 6.

<sup>(6)</sup> La IgM específica puede detectarse generalmente en la sangre a partir de los dos tres días después de la infección y desaparecer tras unos 30-50 días; la IgG específica puede detectarse generalmente en la sangre a partir de los 10 o 14 días después de la infección y durar varios años. El isotipo de la Ig puede determinarse mediante la prueba ELISA descrita en el punto 2 de la parte B del capítulo VIII.

## CAPÍTULO X

*Sueros de referencia de la enfermedad vesicular porcina*

Suero de referencia	Origen	Comentario (7)
1	Suero de cerdo normal (SCN)	Suero de control negativo
2	Suero recogido 21 días después de la infección de un cerdo infectado con la cepa UKG 27/72 (sola) del virus de la enfermedad vesicular porcina	Suero de control fuertemente positivo
3	Dilución de 1:10 en NPS de un suero recogido cinco días después de la infección de un cerdo infectado con la cepa Italia 8/94 del virus de la enfermedad vesicular porcina	Suero de baja positividad tomado de un cerdo al poco tiempo de haberse infectado con una cepa del virus de la enfermedad vesicular porcina aislada recientemente en Europa. El suero se ha diluido para dar un bajo resultado positivo en las pruebas de NV y ELISA
4	Dilución de 1:40 en NPS de un suero recogido 21 días después de la infección de un cerdo infectado con la cepa UKG 27/72 del virus de la enfermedad vesicular porcina	Suero con baja positividad que define el menor nivel de anticuerpos que los laboratorios nacionales de referencia de la Unión Europea pueden reconocer sistemáticamente como positivo mediante las pruebas de neutralización del virus y ELISA Equivalente al suero RS 01-04-94 (8)
5	Suero recogido cuatro días después de la infección a partir de un cerdo infectado con la cepa UKG 27/72 (sola) del virus de la enfermedad vesicular porcina	Suero de baja positividad de un cerdo poco tiempo después de la infección
6	Suero recogido cinco días después de la infección a partir de un cerdo infectado con la cepa UKG 27/72 (sola) del virus de la enfermedad vesicular porcina	Suero de baja positividad de un cerdo poco tiempo después de la infección

(7) Estos comentarios se refieren a las pruebas de los distintos cerdos. Para la serovigilancia ha de tenerse en cuenta la sensibilidad de la prueba.

(8) Es decir, un suero con el título suficientemente mayor que el nivel límite de forma que debe dar siempre positivo en pruebas repetidas de NV y ELISA.