

**DECISÃO DA COMISSÃO**  
**de 26 de Maio de 2003**  
**que aprova um manual de diagnóstico da peste suína africana**

[notificada com o número C(2003) 1696]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2003/422/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 2002/60/CE do Conselho, de 27 de Junho de 2002, que estabelece disposições específicas em relação à luta contra a peste suína africana e que altera a Directiva 92/119/CEE no que respeita à doença de Teschen e à peste suína africana <sup>(1)</sup>, e, nomeadamente, o n.º 3 do seu artigo 18.º,

Considerando o seguinte:

- (1) De acordo com a Directiva 2002/60/CE, é necessário estabelecer procedimentos de diagnóstico, métodos de amostragem e critérios de avaliação dos resultados dos testes laboratoriais de confirmação da peste suína africana uniformes.
- (2) Nos termos da referida directiva, cabe ao laboratório comunitário de referência para a peste suína africana coordenar, em consulta com a Comissão, os métodos utilizados nos Estados-Membros para o diagnóstico da doença, nomeadamente através da organização periódica de testes comparativos e o fornecimento dos reagentes de referência a nível comunitário.
- (3) O vírus da peste suína africana não é considerado um risco para a saúde humana.
- (4) Foram desenvolvidos testes laboratoriais para assegurar a confirmação rápida da peste suína africana.
- (5) A experiência adquirida nos últimos anos no controlo da peste suína africana conduziu à identificação dos métodos de amostragem e dos critérios de avaliação dos resultados dos testes laboratoriais mais adequados para o diagnóstico correcto desta doença em vários tipos de situações.
- (6) É conveniente, por conseguinte, aprovar um manual que estabeleça esses procedimentos e critérios.
- (7) Os laboratórios nacionais de diagnóstico devem ser autorizados a alterar os testes laboratoriais aprovados, ou a utilizar outros testes, desde que possa ser demonstrado que apresentam sensibilidade e especificidade iguais.
- (8) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

*Artigo 1.º*

1. É aprovado o manual de diagnóstico da peste suína africana constante do anexo.
2. Os Estados-Membros assegurarão que a confirmação da peste suína africana seja efectuada em conformidade com os procedimentos, métodos de amostragem e critérios de avaliação dos resultados dos testes laboratoriais estabelecidos no manual, e assente:
  - a) Na detecção de sinais clínicos e de lesões *post mortem* da doença;
  - b) Na detecção de vírus, antigénio ou genoma nas amostras de tecidos, órgãos, sangue ou excreções de suínos;
  - c) Na demonstração de uma resposta imunitária humoral específica em amostras de sangue.
3. Em derrogação do n.º 2, os laboratórios de diagnóstico nacionais referidos no anexo IV da Directiva 2002/60/CE podem utilizar alterações dos testes laboratoriais referidos no manual, ou utilizar testes diferentes, desde que possa ser demonstrado que apresentam sensibilidade e especificidade iguais.

Se forem utilizados testes alterados ou diferentes, a respectiva sensibilidade e especificidade devem ser avaliadas no âmbito dos testes comparativos periódicos organizados pelo laboratório comunitário de referência da peste suína africana.

*Artigo 2.º*

A presente decisão é aplicável a partir de 1 de Julho de 2003.

*Artigo 3.º*

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 26 de Maio de 2003.

*Pela Comissão*  
David BYRNE  
*Membro da Comissão*

<sup>(1)</sup> JO L 192 de 20.7.2002, p. 27.

## ANEXO

## MANUAL DE DIAGNÓSTICO DA PESTE SUÍNA AFRICANA

## Capítulo I

**Introdução, objectivos e definições**

1. Por forma a assegurar métodos uniformes de diagnóstico da peste suína clássica (adiante designada PSA), o presente manual:
  - a) Estabelece directrizes e requisitos mínimos em relação aos métodos de diagnóstico e amostragem e aos critérios de avaliação dos resultados dos exames clínicos e *post mortem* e dos testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico correcto da PSA (<sup>1</sup>);
  - b) Estabelece requisitos mínimos de biossegurança e normas de qualidade que devem ser observados pelos laboratórios de diagnóstico da PSA e no transporte das amostras;
  - c) Estabelece os testes laboratoriais que devem ser utilizados no diagnóstico da PSA e as técnicas laboratoriais empregues na tipagem genética dos isolados de vírus da PSA.
2. O presente manual destina-se sobretudo às autoridades responsáveis pelo controlo da PSA. Neste contexto, confere-se especial destaque aos princípios e aplicações dos testes laboratoriais e à avaliação dos respectivos resultados, e não a técnicas laboratoriais específicas.
3. Para efeitos do disposto no presente manual, para além das definições referidas no artigo 2.º da Directiva 2002/60/CE, aplicam-se as definições que se seguem:
  - a) «Exploração suspeita» é qualquer exploração suínica que contém um ou mais suínos suspeitos de estar infectados com o vírus da PSA, ou uma exploração de contacto, tal como definida na alínea k) do artigo 2.º da Directiva 2002/60/CE;
  - b) «Subunidade epidemiológica» ou «subunidade» é qualquer edifício, local ou terreno vizinho em que são mantidos grupos de suínos em contacto directo ou indirecto frequente entre si, que, entretanto, são mantidos separados de outros suínos da mesma exploração;
  - c) «Suínos em contacto» são suínos que viveram numa exploração em contacto directo com um ou mais suínos suspeitos de estarem infectados com o vírus da PSA no decurso dos 21 dias precedentes.

## Capítulo II

**Descrição da PSA, com especial ênfase no diagnóstico diferencial**

## A. INTRODUÇÃO

1. A PSA é causada por um vírus de ADN com invólucro pertencente ao género *Asfivirus* da família dos *Asfarviridae*. As estirpes de vírus da PSA diferem quanto à virulência, embora não possam ser identificados serótipos diferentes.
2. O vírus da PSA é muito estável nas excreções de suínos infectados, nas carcaças de suínos, na carne de suíno fresca e nalguns produtos à base de carne de suíno. É necessário utilizar desinfectantes adequados para assegurar a sua inactivação no meio ambiente.
3. A principal via natural de infecção dos suínos na Europa é a oronasal, por contacto directo ou indirecto com suínos infectados ou através do fornecimento de alimentos para animais contaminados pelo vírus. Contudo, a transmissão por vectores (<sup>2</sup>), nas zonas em que existem, desempenha um papel muito importante na persistência e propagação do vírus. A PSA pode também propagar-se por contacto indirecto com materiais contaminados e por insectos picadores que transportem mecanicamente o vírus. Também pode verificar-se a transmissão da doença através do sêmen de varrascos infectados.
4. Nos animais individuais, o período de incubação é de cerca de cinco a quinze dias, embora a nível das explorações, em condições reais, os sintomas clínicos possam tornar-se evidentes somente várias semanas após a introdução do vírus, ou até mais tarde, se se tratar de estirpes de vírus pouco virulentas.

(<sup>1</sup>) A decisão sobre o número de amostras a recolher para os testes laboratoriais deve igualmente atender à sensibilidade de tais testes. O número de animais objecto de amostragem deve ser superior ao indicado no presente manual caso a sensibilidade do teste utilizado não seja muito elevada.

(<sup>2</sup>) De acordo com a definição da alínea r) do artigo 2.º da Directiva 2002/60/CE.

5. A PSA apresenta as formas aguda, subaguda e crónica, dependendo sobretudo da virulência do vírus.
6. Em suínos que tenham recuperado clinicamente de uma infecção, a virémia persiste por 40 a 60 dias; estes animais tornam-se, assim, portadores do vírus. O vírus da PSA já foi isolado em suínos portadores até seis meses após a infecção.

#### B. FORMA AGUDA

1. A febre alta (mais de 40 °C) constitui normalmente o primeiro sinal clínico da doença, sendo acompanhada de depressão, perda de apetite, respiração rápida e difícil e corrimentos nasais e oculares. Os suínos apresentam descoordenação motora e chegam-se uns os outros. As porcas podem abortar em qualquer fase da gravidez. Alguns suínos podem apresentar vômitos e obstipação, enquanto outros apresentam diarreia sanguinolenta. Tornam-se visíveis zonas subcutâneas congestionadas ou hemorrágicas, nomeadamente nas extremidades e nas orelhas. A morte, que pode ser precedida de coma, sobrevem entre o primeiro e o sétimo dia após o aparecimento dos sinais clínicos. As taxas de morbidade e de mortalidade numa exploração podem atingir os 100 %.

As observações *post mortem* indicam um síndrome hemorrágico típico, com congestão generalizada da carcaça, fluido sanguinolento nas cavidades torácica e abdominal, baço aumentado e escuro, gânglios linfáticos hemorrágicos com a aparência de coágulos, sobretudo os renais e os gastrohepáticos, hemorragias petequiais nos rins, na parte cortical e medular das pirâmides e no pélvis renal, nas serosas abdominais, nas mucosas gástricas e entéricas e no coração, no epicárdio e no endocárdio, hidrotórax e hemorragias petequiais da pleura.

2. Em termos gerais, a forma aguda da peste suína clássica conduz a uma situação clínica e patológica muito semelhante à da peste suína africana. Quando existem, as hemorragias cutâneas e auriculares são muito facilmente detectáveis e sugerem a existência de peste suína clássica ou africana aguda. Poucas outras doenças causam lesões análogas.

A forma aguda da peste suína africana deve ser considerada em caso de suspeita de erisipela, síndrome reprodutivo e respiratório dos suínos, intoxicação por cumarina, púrpura hemorrágica, síndrome de caquexia multissistémica pós-desmame, síndrome de dermatite e nefropatia dos suínos, infecções por *Salmonella* ou *Pasteurella* ou de outros síndromes entéricos ou respiratórios que não respondam ao tratamento com antibióticos.

#### C. FORMAS SUBAGUDAS

As formas subagudas da doença são mais comuns em zonas endémicas. A infecção subaguda caracteriza-se por febre flutuante, depressão e pneumonia. A morte pode sobrevir devido a insuficiência cardíaca. As lesões são semelhantes às da forma aguda, mas mais ligeiras. São lesões características as grandes hemorragias nos gânglios linfáticos, nos rins e no baço, a congestão e edema dos pulmões e, nalguns casos, a pneumonia intersticial.

#### D. FORMAS CRÓNICAS

As formas crónicas da doença são raras. Nestas formas, podem observar-se infecções bacterianas secundárias. Uma vez que os sinais clínicos de PSA crónica são bastante inespecíficos, o diagnóstico diferencial deve abranger muitas outras doenças. A febre não está necessariamente presente em todos os animais, muito embora nas explorações afectadas a febre possa ser detectada em pelo menos alguns suínos.

Os sintomas clínicos da forma crónica da PSA podem incluir problemas respiratórios, abortos, artrite, úlceras cutâneas crónicas ou necroses, e não se assemelham ao quadro clínico característico das infecções pelo vírus da PSA. As lesões podem ser mínimas ou inexistentes. As alterações histopatológicas são caracterizadas por gânglios linfáticos e baço aumentados, pleurite, pericardite fibrilar e pneumonite infiltrativa. Foram também descritas a necrose caseosa focal e a mineralização do pulmão.

### Capítulo III

#### **Directrizes sobre os principais critérios a ponderar com vista ao reconhecimento de uma exploração como sendo uma exploração suspeita de PSA**

1. A decisão de reconhecer uma exploração como sendo uma exploração suspeita basear-se-á nos seguintes dados, critérios e justificações:
  - a) Dados clínicos e anatomopatológicos observados nos suínos. Os principais dados clínicos e anatomopatológicos a ponderar são os seguintes:
    - febre com morbidade e mortalidade em suínos de todas as idades,
    - febre com síndrome hemorrágica; hemorragias petequiais e equimóticas, especialmente nos gânglios linfáticos, rins, baço (que se apresenta aumentado e escuro, sobretudo nas formas agudas) e na bexiga, e ulcerações da vesícula biliar;

- b) Dados epidemiológicos. Os principais dados epidemiológicos a ponderar são os seguintes:
- apurar se os suínos estiveram em contacto directo ou indirecto com uma exploração suínola comprovadamente infectada pelo vírus da PSA,
  - apurar se uma exploração forneceu suínos que subsequentemente se comprovou estarem infectados pelo vírus da PSA,
  - apurar se as porcas foram artificialmente inseminadas com sémen proveniente de uma fonte suspeita,
  - apurar se houve contacto directo ou indirecto com suínos selvagens de uma população com PSA,
  - apurar se os suínos são mantidos ao ar livre numa região em que os suínos selvagens estão infectados pelo vírus da PSA,
  - apurar se os suínos foram alimentados com lavaduras e se se suspeita de que tais lavaduras não foram tratadas por forma a inactivar o vírus da PSA,
  - apurar se pode ter ocorrido exposição (por exemplo, devido às pessoas que entram na exploração ou aos transportes provenientes de explorações infectadas, ou que se suspeite estarem infectadas, pelo vírus da PSA),
  - apurar se existem vectores na zona em que se situa a exploração.
2. Uma exploração deve, em qualquer caso, ser considerada suspeita se tiver sido suspeitada a ocorrência de peste suína clássica com base em dados clínicos ou anatomopatológicos, sem que os exames clínicos, epidemiológicos e laboratoriais tenham levado à confirmação desta doença nem à identificação de outras fontes ou agentes patológicos na exploração em causa.

#### Capítulo IV

#### Métodos de verificação e amostragem

#### A. DIRECTRIZES E PROCEDIMENTOS RELATIVOS AO EXAME CLÍNICO E À AMOSTRAGEM EM SUÍNOS DE EXPLORAÇÕES SUSPEITAS

1. Os Estados-Membros assegurarão a execução nas explorações suspeitas dos exames clínicos, da amostragem e dos exames laboratoriais adequados para a confirmação ou exclusão da PSA, em conformidade com as directrizes e procedimentos estabelecidos nos pontos 2 a 6 *infra*.

Independentemente da adopção na exploração em questão das medidas referidas no n.º 2 do artigo 4.º da Directiva 2002/60/CE, tais directrizes e procedimentos aplicar-se-ão igualmente em casos de doença sempre que a PSA seja considerada no âmbito do diagnóstico diferencial. É o que sucede mesmo quando os sinais clínicos e a situação epidemiológica da doença observados em suínos sugerem uma probabilidade muito reduzida de ocorrência de PSA.

Em todos os outros casos, sempre que se suspeite da infecção pelo vírus da PSA de um ou mais suínos, serão adoptadas na exploração suspeita em questão as medidas referidas no n.º 2 do artigo 4.º da Directiva 2002/60/CE.

Em caso de suspeita de PSA em suínos presentes num matadouro ou meio de transporte, aplicar-se-ão também, *mutatis mutandis*, as directrizes e procedimentos estabelecidos nos pontos 2 a 6 *infra*.

2. Quando um veterinário oficial visita uma exploração suspeita para confirmar ou excluir a presença de PSA:
- deve proceder-se à verificação dos registos de produção e dos registos sanitários da exploração, caso os haja; deve efectuar-se uma inspecção de todas as subunidades da exploração, a fim de seleccionar os suínos que vão ser sujeitos a exame clínico.

O exame clínico deve incluir a medição da temperatura corporal e deve abranger sobretudo os seguintes suínos ou grupos de suínos:

- suínos doentes ou anoréxicos,
- suínos recentemente introduzidos provenientes de focos confirmados ou de outras fontes suspeitas,
- suínos mantidos em subunidades recentemente visitadas por pessoas externas que estiveram em contacto estreito recente com suínos suspeitos ou infectados pela PSA ou em relação aos quais tenham sido identificados contactos de alto risco que constituam uma fonte potencial do vírus da PSA,
- suínos que foram já objecto de amostragem e de testes serológicos da PSA, caso os resultados de tais testes não permitam excluir a presença da PSA, e suínos em contacto,
- suínos que tenham recuperado recentemente de uma doença.

Se a inspecção da exploração suspeita não revelar a existência dos suínos ou grupos de suínos referidos no parágrafo anterior, a autoridade competente, sem prejuízo de outras medidas que podem ser aplicadas na exploração em questão em conformidade com o disposto na Directiva 2002/60/CE e tendo em conta a situação epidemiológica, deve:

- proceder a novos exames na exploração em questão, em conformidade com o disposto no ponto 3 *infra*, ou
- assegurar que sejam obtidas amostras de sangue dos suínos da exploração em questão para testes laboratoriais. Nesse caso, devem ser utilizados a título de orientação os métodos de amostragem estabelecidos nos pontos 5 e F.2, ou
- adoptar ou manter as medidas estabelecidas no n.º 2 do artigo 4.º da Directiva 2002/60/CE, enquanto se aguardam novas investigações da exploração em questão, ou
- excluir a suspeita de PSA.

3. Sempre que se remeta para o presente ponto, o exame clínico na exploração em questão deve efectuar-se em suínos seleccionados aleatoriamente nas subunidades em que tenha sido identificado um risco de introdução do vírus da PSA, ou em que haja suspeita de tal risco.

O número mínimo de suínos a examinar deve permitir a detecção de febre nestas subunidades, com um nível de confiança de 95 %, caso a sua prevalência seja de 10 %.

4. Se forem detectados suínos mortos ou moribundos numa exploração suspeita, devem ser efectuados exames *post mortem*, preferivelmente em pelo menos cinco destes suínos, e, designadamente, em suínos:

- que, antes da morte, manifestaram sinais muito evidentes de doença,
- com febre alta,
- mortos recentemente.

Se estes exames não tiverem demonstrado lesões sugestivas de PSA, muito embora, dada a situação epidemiológica, sejam consideradas necessárias novas investigações:

- deve proceder-se a um exame clínico, tal como estabelecido no ponto 3, e à recolha de amostras de sangue, tal como estabelecido no ponto 5, na subunidade em que os suínos mortos ou moribundos eram mantidos, e
- devem efectuar-se exames *post mortem* em três ou quatro suínos em contacto, sobretudo se estes suínos apresentarem sinais clínicos.

Independentemente da existência ou não de lesões sugestivas de PSA, devem ser colhidas amostras de órgãos ou tecidos de suínos sujeitos a exames *post mortem* para testes virológicos, em conformidade com o disposto no ponto B.1 do capítulo V. Estas amostras devem preferivelmente ser colhidas em suínos recentemente mortos.

Caso sejam efectuados exames *post mortem*, a autoridade competente deve assegurar que:

- sejam tomadas as precauções e medidas de higiene necessárias para evitar a propagação da doença, e
- os suínos moribundos sejam abatidos de forma humana, em conformidade com o disposto na Directiva 93/119/CE do Conselho, de 22 de Dezembro de 1993, relativa à protecção dos animais no abate e/ou occisão <sup>(1)</sup>, alterada pelo Regulamento (CE) n.º 806/2003 <sup>(2)</sup>.

5. Se numa exploração suspeita forem detectados mais sinais clínicos ou lesões sugestivos de PSA e a autoridade competente considerar que estes dados são insuficientes para confirmar um surto de PSA, não sendo portanto necessários testes laboratoriais, devem ser colhidas amostras de sangue para testes laboratoriais dos suínos suspeitos e de outros suínos em todas as subunidades em que os suínos suspeitos sejam mantidos, em conformidade com os seguintes procedimentos:

- a) O número mínimo de amostras a colher para os testes serológicos deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % na subunidade em questão;
- b) O número de amostras a colher para os testes virológicos deve estar em conformidade com as instruções da autoridade competente, que deve atender ao leque de testes disponíveis, à sensibilidade dos testes laboratoriais que serão utilizados e à situação epidemiológica.

<sup>(1)</sup> JO L 340 de 31.12.1993, p. 21.

<sup>(2)</sup> JO L 122 de 16.5.2003, p. 1.

6. Se, após a execução do exame numa exploração suspeita, não forem detectados sinais clínicos nem lesões sugestivos de PSA, muito embora a autoridade competente considere necessária a execução de novos testes laboratoriais para excluir a presença de PSA, utilizar-se-ão a título de orientação os métodos de amostragem referidos no ponto 5 *supra*.

#### B. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM NAS EXPLORAÇÕES CASO SEJAM ABATIDOS SUÍNOS APÓS A CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA

1. Para que possa ser determinado o modo de introdução do vírus da PSA na exploração infectada, bem como o período de tempo decorrido desde a sua introdução, caso os suínos de uma exploração sejam abatidos após a confirmação de um surto em conformidade com o n.º 1, alínea a), do artigo 5.º da Directiva 2002/60/CE, aquando do abate dos suínos devem ser colhidas aleatoriamente amostras de sangue para testes serológicos.
2. O número mínimo de suínos em que devem ser colhidas amostras deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % nos suínos de cada uma das subunidades da exploração <sup>(1)</sup>.

Devem também ser colhidas amostras para testes virológicos, em conformidade com as instruções da autoridade competente, que deve atender ao leque de testes disponíveis, à sensibilidade dos testes laboratoriais que serão utilizados e à situação epidemiológica.

Nas zonas em que a presença de vectores infectados pelo vírus da PSA tenha sido previamente demonstrada, devem também ser constituídas colecções adequadas de carraças moles para testes virológicos, em conformidade com as instruções da autoridade competente e com o anexo III da Directiva 2002/60/CE.

3. No entanto, no que respeita aos surtos secundários, a autoridade competente pode decidir derrogar em relação ao estabelecido nos pontos 1 e 2 *supra* e estabelecer outros métodos de amostragem, tomando em consideração os dados epidemiológicos já disponíveis sobre a fonte e a via de introdução do vírus na exploração, bem como a probabilidade de propagação da doença a partir da exploração.

#### C. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM CASO OS SUÍNOS SEJAM ABATIDOS A TÍTULO DE MEDIDA PREVENTIVA NUMA EXPLORAÇÃO SUSPEITA

1. Para que a presença de PSA possa ser confirmada ou excluída e sejam obtidos dados epidemiológicos adicionais, caso os suínos sejam abatidos a título de medida preventiva numa exploração suspeita em conformidade com o disposto no n.º 3, alínea a), do artigo 4.º ou no n.º 2 do artigo 7.º da Directiva 2002/60/CE, devem ser colhidas amostras de sangue para testes serológicos, bem como amostras de sangue para testes virológicos, em conformidade com o procedimento estabelecido no ponto 2.

2. A amostragem deve abranger sobretudo:

- suínos com sinais ou lesões *post mortem* sugestivos de PSA, bem como os suínos em contacto com eles,
- outros suínos que possam ter tido contacto perigoso com suínos infectados ou suspeitos, ou que se suspeite terem sido contaminados com o vírus da PSA. As amostras provenientes destes suínos devem ser obtidas em conformidade com as instruções da autoridade competente, que deve atender à situação epidemiológica.

Além disso, os suínos provenientes de cada uma das subunidades da exploração devem ser objecto de uma recolha de amostras aleatória <sup>(2)</sup>. Nesse caso, o número mínimo de amostras a colher para os testes serológicos deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % na subunidade em questão.

O tipo de amostras a colher com vista aos testes virológicos e o teste a utilizar devem estar em conformidade com as instruções da autoridade competente, que deve atender ao leque de testes disponíveis, à sensibilidade desses testes e à situação epidemiológica.

<sup>(1)</sup> No entanto, caso seja aplicada a derrogação prevista no n.º 1 do artigo 6.º da Directiva 2002/60/CE, a amostragem deve abranger as subunidades da exploração em que os suínos foram abatidos, sem prejuízo da execução de exames e amostragens adicionais nos restantes suínos da exploração, que se processarão em conformidade com as instruções da autoridade competente.

<sup>(2)</sup> No entanto, se a autoridade competente tiver limitado a aplicação do abate preventivo apenas à parte da exploração em que foram mantidos os suínos suspeitos de estarem infectados ou contaminados pelo vírus da PSA, em conformidade com o disposto no n.º 3, alínea a), do artigo 4.º da Directiva 2002/60/CE, a amostragem deve abranger as subunidades da exploração em que esta medida foi aplicada, sem prejuízo da execução de exames e da obtenção de amostras adicionais nos restantes suínos da exploração, que se processarão em conformidade com as instruções da autoridade competente.

D. MÉTODOS DE VERIFICAÇÃO E AMOSTRAGEM ANTES DE SER DADA A AUTORIZAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE SUÍNOS PROVENIENTES DE EXPLORAÇÕES SITUADAS EM ZONAS DE PROTECÇÃO OU VIGILÂNCIA, CASO ESTES SUÍNOS SEJAM ABATIDOS OU OBJECTO DE OCCISÃO (ARTIGOS 10.º E 11.º DA DIRECTIVA 2002/60/CE)

1. Sem prejuízo do disposto no n.º 1, segundo parágrafo da alínea f), do artigo 11.º da Directiva 2002/60/CE, para que possa ser concedida autorização de transferência de suínos provenientes de explorações situadas em zonas de protecção ou vigilância em conformidade com o disposto no n.º 3 do artigo 10.º da referida directiva, o exame clínico efectuado por um veterinário oficial deve:

- ser executado no período de 24 horas que precede a transferência dos suínos,
- ser feito em conformidade com o procedimento previsto no ponto A.2.

2. No que respeita aos suínos transferidos para outras explorações, para além das investigações a efectuar em conformidade com o disposto no ponto 1 *supra*, deve proceder-se ao exame clínico de suínos, incluindo a medição da temperatura de uma certa percentagem dos animais, em cada subunidade da exploração em que são mantidos os suínos que devem ser transferidos.

O número mínimo de suínos a examinar deve permitir a detecção de febre nestas subunidades, com um nível de confiança de 95 %, caso a sua prevalência seja de 10 %.

3. No que respeita aos suínos transferidos para um matadouro, para uma instalação de transformação ou para outros locais a fim de aí serem abatidos ou objecto de occisão, para além das investigações a efectuar em conformidade com o disposto no ponto 1 *supra*, deve proceder-se ao exame clínico de suínos de todas as subunidades em que são mantidos os suínos que devem ser transferidos. No que respeita aos suínos com mais de três a quatro meses de idade, este exame deve abranger a medição da temperatura de uma certa percentagem dos mesmos.

O número mínimo de suínos a examinar deve permitir a detecção de febre nestas subunidades, com um nível de confiança de 95 %, caso a sua prevalência seja de 20 %.

4. Quando os suínos referidos no ponto 3 *supra* forem abatidos ou objecto de occisão, devem ser colhidas, em suínos provenientes de todas as subunidades da exploração de que foram transferidos suínos, amostras de sangue para testes serológicos ou amostras de sangue ou de órgãos como amígdalas, baço ou gânglios linfáticos para testes virológicos.

O número mínimo de amostras a examinar deve permitir a detecção de uma seroprevalência — ou prevalência do vírus — de 10 % com um nível de confiança de 95 %.

O tipo de amostras a colher e o teste a utilizar devem estar em conformidade com as instruções da autoridade competente, que deve atender ao leque de testes disponíveis, à sensibilidade desses testes e à situação epidemiológica.

5. No entanto, em derrogação do disposto no ponto 4 *supra*, se forem detectados sinais clínicos ou lesões *post mortem* sugestivos de PSA quando os suínos forem abatidos ou objecto de occisão, serão aplicáveis as disposições relativas à amostragem estabelecidas no ponto C.
6. A derrogação prevista no n.º 5 do artigo 10.º e no n.º 4 do artigo 11.º da Directiva 2002/60/CE pode ser concedida se as autoridades competentes assegurarem a execução de um programa intensivo de colheita e análise de amostras abrangendo igualmente os grupos de suínos a controlar ou submeter à colheita de amostras, referidos nos pontos 2, 3 e 4 *supra*. No âmbito deste programa, o número mínimo de amostras a colher deve permitir a detecção, no grupo de suínos em causa, de uma seroprevalência de 5 % com um nível de confiança de 95 %.

E. MÉTODOS DE VERIFICAÇÃO E AMOSTRAGEM NUMA EXPLORAÇÃO NO ÂMBITO DO REPOVOAMENTO

1. Se numa exploração forem reintroduzidos suínos em conformidade com o disposto no n.º 3 do artigo 13.º da Directiva 2002/60/CE, devem ser utilizados os seguintes métodos de amostragem:

- devem ser colhidas amostras de sangue uma vez decorridos 45 dias, no mínimo, sobre a reintrodução dos suínos,
- no que respeita à reintrodução de suínos testemunha, devem ser colhidas aleatoriamente amostras de sangue para testes serológicos num número de suínos que permita a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração,
- no que respeita ao repovoamento total, devem ser colhidas aleatoriamente amostras de sangue para testes serológicos num número de suínos que permita a detecção de uma seroprevalência de 20 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração.

2. Se numa exploração forem reintroduzidos suínos em conformidade com o disposto no n.º 4 do artigo 13.º da Directiva 2002/60/CE, devem ser utilizados os seguintes métodos de amostragem:

- devem ser colhidas amostras de sangue uma vez decorridos 45 dias, no mínimo, sobre a reintrodução dos suínos,
- no que respeita à reintrodução de suínos testemunha, devem ser colhidas aleatoriamente amostras de sangue para testes serológicos num número de suínos que permita a detecção de uma seroprevalência de 5 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração,
- no que respeita ao repovoamento total, devem ser colhidas aleatoriamente amostras de sangue para testes serológicos num número de suínos que permita a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração.

Em seguida, o procedimento descrito no terceiro travessão deve ser repetido uma vez decorridos 60 dias, no mínimo, sobre o repovoamento total.

3. Após qualquer reintrodução de suínos, a autoridade competente deve assegurar que, em caso de doença ou morte dos suínos na exploração por motivos desconhecidos, os suínos em questão sejam imediatamente testados em relação à PSA.

As presentes disposições aplicar-se-ão até que as restrições às deslocações de suínos referidas no n.º 3, alíneas a) e b), e n.º 4 do artigo 13.º da Directiva 2002/60/CE sejam levantadas na exploração em questão.

#### F. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM EXPLORAÇÕES SITUADAS NA ZONA DE PROTECÇÃO, ANTES DO LEVANTAMENTO DAS RESTRIÇÕES

1. Para que as medidas referidas no artigo 10.º da Directiva 2002/60/CE possam ser levantadas numa zona de protecção, é necessário que em todas as explorações da zona:

- seja efectuado um exame clínico em conformidade com os procedimentos estabelecidos nos pontos A.2 e A.3,
- sejam colhidas amostras de sangue para testes serológicos, tal como estabelecido no ponto 2 *infra*.

2. O número mínimo de amostras de sangue a colher deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 10 % com um nível de confiança de 95 % nos suínos de cada uma das subunidades da exploração.

Contudo, a derrogação prevista no n.º 5 do artigo 10.º e no n.º 4 do artigo 11.º da Directiva 2002/60/CE só pode ser concedida se a autoridade competente assegurar que o número de amostras de sangue colhidas permite a detecção de uma seroprevalência de 5 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração.

#### G. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM EXPLORAÇÕES SITUADAS NA ZONA DE VIGILÂNCIA, ANTES DO LEVANTAMENTO DAS RESTRIÇÕES

1. Para que numa zona de vigilância possam ser levantadas as medidas referidas no artigo 11.º da Directiva 2002/60/CE, deve efectuar-se um exame clínico em todas as explorações da zona, em conformidade com os procedimentos estabelecidos no ponto A.2.

Além disso, devem ser colhidas amostras de sangue de suínos para testes serológicos:

- em qualquer outra exploração em que a autoridade competente considere necessária uma amostragem,
- em todos os centros de colheita de sêmen.

2. Sempre que se proceda à amostragem de sangue com vista a testes serológicos em explorações situadas na zona de vigilância, o número de amostras de sangue a obter nessas explorações deve estar em conformidade com o disposto no primeiro período do ponto F.2.

Contudo, a derrogação prevista no n.º 5 do artigo 10.º e no n.º 4 do artigo 11.º da Directiva 2002/60/CE só pode ser concedida se a autoridade competente assegurar que sejam colhidas amostras de sangue para testes serológicos em cada exploração da zona. O número mínimo de amostras de sangue a colher deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 5 % com um nível de confiança de 95 % em cada subunidade da exploração.



#### H. MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO E AMOSTRAGEM SEROLÓGICA EM ÁREAS EM QUE HAJA SUSPEITA OU CONFIRMAÇÃO DE PSA EM SUÍNOS SELVAGENS

1. No que respeita à monitorização serológica de suínos selvagens em áreas em que haja suspeita ou confirmação de PSA, a dimensão e a área geográfica da população-alvo em que há que obter amostras deve ser previamente definida, para se determinar o número de amostras que devem ser colhidas. A dimensão da amostra deve ser estabelecida em função do número estimado de animais vivos e não em função do número de animais abatidos.
2. Se não existirem dados sobre a densidade e a dimensão da população, a área geográfica em que se deve proceder à amostragem deve ser definida tendo em conta a presença permanente de suínos selvagens e de barreiras naturais ou artificiais que impeçam grandes movimentos contínuos de animais. Se tais circunstâncias se não verificarem, ou se se tratar de grandes zonas, recomenda-se a criação de áreas de amostragem com cerca de 200 km<sup>2</sup>, em que possam viver habitualmente cerca de 400 a 1 000 suínos selvagens.
3. Sem prejuízo do disposto no n.º 2, alínea c), do artigo 15.º da Directiva 2002/60/CE, o número mínimo de suínos em que devem ser colhidas amostras dentro da área de amostragem definida deve permitir a detecção de uma seroprevalência de 5 % com um nível de confiança de 95 %. Para este efeito, devem ser colhidas amostras em pelo menos 56 animais em cada área definida.
4. A recolha de amostras para testes virológicos em suínos selvagens abatidos ou encontrados mortos deve efectuar-se em conformidade com o disposto no ponto B.1 do capítulo V.

Se for considerada necessária, a monitorização virológica dos suínos selvagens abatidos deve ter por objecto sobretudo os animais com idade inferior a um ano.

5. Todas as amostras a enviar ao laboratório devem ser acompanhadas do questionário referido no n.º 3, alínea h), do artigo 16.º da Directiva 2002/60/CE.

#### Capítulo V

##### *Procedimentos e critérios gerais aplicáveis à colheita e transporte de amostras*

#### A. PROCEDIMENTOS E CRITÉRIOS GERAIS

1. Antes de se proceder à amostragem numa exploração suspeita, deve ser elaborado um mapa da exploração e há que identificar as suas subunidades epidemiológicas.
2. Sempre que se considere poder ser necessária a repetição da amostragem nos suínos, todos os suínos por ela abrangidos devem dispor de uma marcação específica, por forma a facilitar tal repetição.
3. Todas as amostras devem ser enviadas para o laboratório acompanhadas dos formulários adequados, em conformidade com os requisitos estabelecidos pela autoridade competente. Estes formulários devem incluir pormenores sobre os antecedentes dos suínos sujeitos à amostragem, bem como a indicação dos sinais clínicos e das lesões *post mortem* observados.

No que respeita aos suínos mantidos em explorações, deve ser apresentada informação clara sobre a idade, categoria e exploração de origem dos suínos sujeitos à amostragem. Recomenda-se o registo do local da exploração em que se encontra cada suíno sujeito a amostragem, bem como da marca de identificação única.

#### B. RECOLHA DE AMOSTRAS PARA TESTES VIROLÓGICOS

1. Para a detecção do vírus, do antigénio ou do genoma da PSA em suínos mortos ou eutanasiados, as amostras mais adequadas são as provenientes dos tecidos das amígdalas, dos gânglios linfáticos (gastrohepáticos, renais, submandibulares e retrofaríngeos), do baço, do rim ou dos pulmões<sup>(1)</sup>. Se se tratar de carcaças autolisadas, é preferível utilizar como amostra um osso longo inteiro ou o esterno.
2. Devem ser colhidas, em conformidade com as instruções da autoridade competente, amostras de sangue coagulado e/ou não coagulado de suínos que apresentem febre ou outros sinais de doença.

<sup>(1)</sup> Recomenda-se colher igualmente amostras do fêo, que podem ser úteis para o diagnóstico da peste suína clássica.

## C. TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

1. Recomenda-se que todas as amostras:
  - estejam convenientemente identificadas,
  - sejam transportadas e armazenadas em contentores estanques,
  - sejam refrigeradas; contudo, se estiver previsto que as amostras só cheguem ao laboratório mais de 48 horas depois, o laboratório deve ser contactado a fim de obter instruções quanto às condições de temperatura mais adequadas durante o transporte,
  - sejam entregues ao laboratório o mais rapidamente possível,
  - sejam conservadas numa embalagem com placas refrigeradas ou gelo seco, para refrigeração,
  - de tecidos ou órgãos sejam colocadas numa embalagem de plástico selada e adequadamente rotulada. Devem então ser colocadas em embalagens maiores e almofadadas com material absorvente em quantidade suficiente para evitar a sua deterioração e absorver os líquidos derramados,
  - se possível, sejam transportadas directamente para o laboratório por uma pessoa competente, por forma a assegurar o seu transporte rápido e adequado.
2. A parte externa da embalagem deve ter aposto o endereço do laboratório receptor e conter a seguinte menção bem visível:

«Material anatomopatológico animal; Perecível; Frágil; Não abrir fora de um laboratório dedicado à PSA».
3. A pessoa responsável, no laboratório que recebe as amostras, deve ser informada atempadamente da chegada das amostras.
4. No que respeita ao transporte aéreo de amostras para o laboratório comunitário de referência da PSA <sup>(1)</sup> a embalagem deve estar rotulada de acordo com a regulamentação da IATA.

## Capítulo VI

**Princípios e aplicação dos testes virológicos e avaliação dos respectivos resultados**

## A. DETECÇÃO DO ANTIGÉNIO VÍRICO

1. Teste de imunofluorescência directa

O princípio do teste é a detecção microscópica do antigénio vírico em esfregaços por impressão ou criosecções delgadas de material orgânico proveniente de suínos suspeitos de estarem infectados pelo vírus da PSA. Os antigénios intracelulares são detectados utilizando anticorpos específicos conjugados ao FITC <sup>(2)</sup>. No citoplasma das células infectadas aparecem inclusões ou grânulos fluorescentes.

O rim, o baço e vários gânglios linfáticos são exemplo de órgãos adequados. No que respeita aos suínos selvagens, pode igualmente utilizar-se um esfregaço da medula óssea, se os órgãos se não encontrarem disponíveis ou tiverem sido autolisados.

O teste pode ser executado em duas horas. Dado que as amostras de órgãos apenas podem ser obtidas em animais mortos, a sua utilidade para efeitos de rastreio é limitada.

Trata-se de um teste extremamente sensível para casos de PSA aguda. Em relação às formas subagudas e crónicas, a sensibilidade deste teste é apenas de cerca de 40 %, provavelmente devido à presença de complexos antigénio-anticorpo, que bloqueiam a reacção com o anticorpo anti-ASF conjugado. A confiança no resultado do teste pode ser limitada por uma coloração incerta, sobretudo se não tiver sido adquirida experiência considerável na execução do teste ou se os órgãos testados estiverem autolisados.

2. Teste ELISA para a detecção de antigénio

O antigénio vírico pode também ser detectado através da utilização de técnicas ELISA, mas estas só são recomendadas para as formas agudas da doença, pela sua baixa sensibilidade em presença de complexos antigénio-anticorpo. A sensibilidade do teste ELISA para a detecção de antigénio deve ser suficientemente elevada para que se obtenha um resultado positivo com animais que apresentem sinais clínicos de PSA aguda. Recomenda-se, de qualquer forma, que este teste seja utilizado apenas como teste «de efectivo» e juntamente com outros testes virológicos.

<sup>(1)</sup> O laboratório comunitário de referência tem uma autorização ilimitada para receber amostras para fins diagnósticos e isolados do vírus da PSA de qualquer outro Estado-Membro. Para amostras provenientes de países terceiros pode ser solicitada a este laboratório, antes do transporte, uma cópia da autorização de importação, a qual pode ser inserida num envelope e colada à parte externa da embalagem.

<sup>(2)</sup> Isotiocianato de fluoresceína.

## B. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS PELO TESTE DE HEMADSORÇÃO

1. O isolamento do vírus baseia-se na inoculação de material da amostra em culturas primárias de células sensíveis de origem porcina, monócitos e macrófagos. Os materiais mais adequados para o isolamento do vírus da PSA são o sangue total e os leucócitos obtidos a partir de amostras de sangue não coagulado ou dos órgãos referidos no ponto A.1. Se existir na amostra, o vírus da PSA replica-se nessas células, provocando o efeito citopático característico nas células infectadas.
2. A técnica da hemadsorção é recomendada para a identificação de isolados do vírus da PSA, devido à sua grande sensibilidade e especificidade. Esta técnica baseia-se na capacidade do vírus da PSA de se replicar nos macrófagos de suínos e de induzir a hemadsorção em presença de eritrócitos de suínos. Em torno dos macrófagos, os eritrócitos formam uma «roseta» característica. Um pequeno número de estirpes de campo do vírus da PSA pode, contudo, não induzir hemadsorção, embora produzindo o efeito citopático. Estas estirpes podem ser especificamente identificadas utilizando o teste de imunofluorescência directa nos sedimentos das culturas celulares, ou por PCR.
3. O isolamento do vírus é mais indicado para o exame de amostras de um número reduzido de animais, do que para a vigilância em larga escala. O processo de isolamento do vírus é trabalhoso e requer um a três dias para que se obtenham resultados. Podem ser necessárias duas outras passagens em culturas de células para detectar pequenas quantidades de vírus presentes na amostra. Tal facto implica que podem ser necessários até 10 dias para que se obtenha o resultado final. As amostras autolisadas podem ter efeito citotóxico na cultura de células, e, por conseguinte, ter uma utilidade limitada.
4. O isolamento e identificação do vírus por hemadsorção deve ser utilizado como teste de referência para a confirmação de resultados positivos após a execução de testes ELISA, PCR ou de imunofluorescência directa. São também recomendados caso a PSA já tenha sido confirmada por outros métodos, em particular em presença de um foco ou caso primário de PSA.

Os vírus da PSA isolados em macrófagos de suínos podem ser utilizados para a caracterização do vírus e para a epidemiologia molecular.

5. Todos os isolados de vírus da PSA provenientes de todos os focos primários, casos primários em suínos selvagens ou casos detectados em matadouros ou meios de transporte devem ser caracterizados num laboratório nacional de referência de um dos Estados-Membros, ou em qualquer outro laboratório autorizado pelo Estado-Membro em questão ou pelo laboratório comunitário de referência, em conformidade com o disposto no ponto E.

Tais isolados de vírus devem ser sempre prontamente enviados para o laboratório comunitário de referência, para integração na colecção de vírus.

## C. DETECÇÃO DO GENOMA VÍRICO

1. A reacção da polimerase em cadeia (PCR) é utilizada para a detecção do genoma vírico em amostras de sangue, soro, tecidos ou órgãos. Pequenos fragmentos de ADN vírico são amplificados pela PCR até se alcançarem quantidades detectáveis. Utilizando iniciadores de uma região do genoma altamente conservada, é possível detectar uma grande variedade de isolados pertencentes a todos os genótipos conhecidos do vírus, incluindo os que não induzem hemadsorção e os de fraca virulência. Dado que este teste apenas detecta uma sequência genómica do vírus, a PCR pode ser positiva até mesmo em situações em que não seja detectado nenhum vírus infeccioso por isolamento (por exemplo, em tecidos autolisados, ou em amostras de suínos convalescentes ou de suínos que, tendo recuperado, se tenham tornado clinicamente normais).
2. A PCR pode ser utilizada num número limitado de amostras cuidadosamente seleccionadas de animais suspeitos. É o método recomendado para amostras de órgãos que sejam citotóxicas, tornando impossível o isolamento do vírus (por exemplo, amostras de suínos selvagens).
3. O material de amostragem adequado para a PCR são os órgãos descritos para o isolamento do vírus e o soro. Podem também ser analisados por esta técnica os homogeneizados de carraça.
4. A PCR pode ser executada num dia de trabalho. Requer equipamento laboratorial adequado, instalações separadas e pessoal habilitado. Uma das suas vantagens é não exigir a replicação da forma infecciosa do vírus no laboratório. A PCR é altamente sensível, embora muito sujeita a contaminação, a qual pode conduzir a falsos resultados positivos. Por conseguinte, são essenciais procedimentos rigorosos de controlo da qualidade.

#### D. TESTES VIROLÓGICOS RECOMENDADOS E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Os testes virológicos são essenciais para a confirmação da PSA.

O isolamento do vírus e a hemadsorção devem ser considerados os testes virológicos de referência e devem ser utilizados como testes confirmativos sempre que necessário. A sua utilização é particularmente recomendada caso os resultados positivos do teste de imunofluorescência directa ou da PCR não estejam associados à detecção de sinais clínicos ou de lesões da doença, bem como em qualquer outro caso de dúvida.

Contudo, um foco primário de PSA pode ser confirmado se forem detectados sinais clínicos ou lesões da doença nos suínos em questão e se pelo menos dois testes distintos de detecção do antígeno, do genoma ou de anticorpos apresentarem resultados positivos em amostras provenientes do mesmo suíno suspeito.

Um foco secundário de PSA pode ser confirmado se, para além da relação epidemiológica com um foco ou caso confirmado, forem detectados sinais clínicos ou lesões da doença nos suínos em questão e se um teste de detecção do antígeno, do genoma ou de anticorpos apresentar um resultado positivo.

Os casos primários de PSA em suínos selvagens podem ser confirmados através do isolamento do vírus ou de resultados positivos em pelo menos dois testes de detecção do antígeno, do genoma ou de anticorpos. Um resultado positivo num teste de detecção do antígeno, do genoma ou de anticorpos pode confirmar novos casos de PSA em suínos selvagens que tenham uma relação epidemiológica com casos anteriormente confirmados.

#### E. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE VÍRUS DA PSA

1. A caracterização genética dos isolados de vírus da PSA faz-se através da determinação dos perfis de restrição e da sequência de nucleótidos de partes do genoma vírico. A similaridade destes perfis de restrição ou sequências com os já obtidos em vírus isolados anteriormente pode indicar se os focos da doença são causados por vírus de modelo molecular europeu ou africano.

A caracterização genética dos isolados de vírus da PSA é fundamental para aumentar o conhecimento que temos da epidemiologia molecular da PSA e da variação genética dos vírus. Os dados relativos à estrutura molecular permitem a classificação de novos isolados e dão indicações quanto à sua origem possível.

2. Se a caracterização molecular não puder efectuar-se rapidamente num laboratório nacional ou em qualquer outro laboratório autorizado a diagnosticar a PSA, a amostra original ou o isolado de vírus devem ser enviados para o laboratório comunitário de referência, a fim de que a sua caracterização molecular seja feita o mais rapidamente possível.

Os dados relativos à análise por enzimas de restrição e à sequenciação dos isolados de vírus da PSA de que dispõem os laboratórios autorizados a diagnosticar a PSA devem ser enviados ao laboratório comunitário de referência, para que a informação possa ser introduzida na base de dados mantida por este laboratório.

A informação constante da base de dados deve encontrar-se à disposição de todos os laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros. No entanto, para efeitos de publicação em revistas científicas, caso tal seja solicitado pelo laboratório em questão, o laboratório comunitário de referência deve assegurar a confidencialidade de tais dados até à sua publicação.

### Capítulo VII

#### *Princípios e aplicação dos testes serológicos e avaliação dos respectivos resultados*

#### A. PRINCÍPIOS BÁSICOS E VALOR DIAGNÓSTICO

1. A pesquisa de anticorpos específicos contra a PSA é recomendada nas formas subagudas e crónicas e ainda nos testes em grande escala e nos programas de erradicação da PSA, por diversas razões:
  - i) em suínos infectados, a produção de anticorpos tem lugar muito rapidamente. Nestes suínos, os anticorpos são geralmente detectáveis em amostras de soro a partir de sete a dez dias após a infecção,
  - ii) não existem vacinas contra a PSA. Por conseguinte, os anticorpos dirigidos especificamente contra a PSA são exclusivamente induzidos pela infecção por vírus da PSA, e
  - iii) a persistência da produção de anticorpos. Em suínos que tenham recuperado da doença, podem ser detectados elevados níveis de anticorpos específicos durante muitos meses, ou até, em certos casos, por toda a vida.

Podem ser detectados em leitões anticorpos específicos anti-VPSA de origem materna durante as primeiras dez semanas de vida. A semivida dos anticorpos maternos nos leitões é de cerca de três semanas. Caso estejam presentes em leitões com mais de três meses de idade, é muito improvável que os anticorpos contra a PSA sejam de origem materna.

2. A detecção de anticorpos contra o vírus da PSA no exsudado sérico ou plasmático dos órgãos apresentados ajuda ao estabelecimento do diagnóstico da PSA em explorações suspeitas, à estimativa da data de introdução da infecção num foco confirmado e à monitorização e vigilância.

A localização dos suínos seropositivos na exploração pode fornecer dados valiosos sobre o modo e local de penetração do vírus da PSA na exploração.

No entanto, deve proceder-se à avaliação rigorosa dos resultados dos testes serológicos, tendo em conta todos os resultados clínicos, virológicos e epidemiológicos obtidos no âmbito do inquérito efectuado em caso de suspeita ou confirmação de PSA em conformidade com o disposto no artigo 8.º da Directiva 2002/60/CE.

#### B. TESTES SEROLÓGICOS RECOMENDADOS

1. Os testes ELISA, de imunofluorescência indirecta e de imunotransferência são os testes de primeira escolha na confirmação serológica da PSA.

A qualidade e eficácia do diagnóstico serológico efectuado pelos laboratórios nacionais deve ser periodicamente verificada no âmbito do teste comparativo entre laboratórios organizado regularmente pelo laboratório comunitário de referência.

2. O teste ELISA é o mais fiável e o mais útil para os estudos serológicos em grande escala. Baseia-se na detecção de anticorpos contra o vírus da PSA ligados a proteínas víricas fixadas a uma base sólida, por adição de proteína A conjugada a um enzima que produz uma coloração visível ao reagir com o substrato adequado.
3. Os laboratórios nacionais devem proceder periodicamente ao controlo de qualidade de cada lote de reagentes ELISA no que diz respeito à sensibilidade e especificidade, utilizando o painel de soros de referência fornecido pelo laboratório comunitário de referência. Este painel incluirá:

- soro de suínos na fase inicial da infecção por vírus da PSA (menos de 17 dias após a infecção),
- soro de suínos convalescentes (mais de 17 dias após a infecção).

Os testes ELISA a utilizar no diagnóstico serológico da PSA devem detectar todos os soros de referência dos suínos convalescentes. Todos os resultados obtidos com os soros de referência devem ser reprodutíveis. Recomenda-se que os testes a utilizar detectem igualmente todos os soros positivos da fase inicial. Os resultados obtidos com os soros de referência de suínos na fase inicial da infecção dão uma indicação da sensibilidade do teste ELISA.

4. A imunofluorescência indirecta é uma técnica de grande sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos contra a PSA, tanto em soros como em exsudados de tecidos. Baseia-se na detecção de anticorpos contra a PSA que se ligam a proteínas víricas de uma monocamada de células MS infectadas com um vírus da PSA adaptado. A reacção anticorpo-antigénio é detectada por intermédio de proteína A marcada com fluoresceína. Nas amostras positivas observa-se uma fluorescência específica perto do núcleo das células infectadas.

A utilização combinada de imunofluorescência directa e indirecta na análise de órgãos, sangue e exsudados de animais com sinais clínicos de PSA podem levar a uma confirmação rápida e fiável da doença.

5. A imunotransferência é uma técnica altamente específica e sensível, baseada na utilização de bandas de nitrocelulose contendo, como antigénio, proteínas víricas. A reacção específica anticorpo-antigénio é detectada por adição de um conjugado de proteína A com peroxidase, e de um substrato adequado. É muito útil para testar soros em relação aos quais o teste ELISA produziu resultados inconcludentes.

#### Capítulo VIII

##### **Requisitos mínimos de segurança no que respeita aos laboratórios da PSA**

1. Os requisitos estabelecidos no quadro 1 devem ser observados por todos os laboratórios que procedam à amplificação do vírus da PSA por replicação em culturas celulares. No entanto, os exames *post mortem* e o processamento de tecidos com vista ao teste de imunofluorescência directa ou à PCR e à serologia com antigénio inactivado podem ser efectuados com um grau de contenção menor, desde que sejam respeitados os requisitos mínimos estabelecidos no quadro 1 e as medidas básicas de higiene e desinfeção subsequente, com eliminação segura das carcaças, tecidos e soros.

2. Os requisitos mínimos estabelecidos no quadro 2 devem ser observados por todos os laboratórios que inoculem animais com o vírus da PSA.
3. Todas as existências do vírus da PSA devem ser mantidas em armazenamento seguro, congeladas ou liofilizadas. Todas as ampolas individuais devem ser claramente rotuladas e devem ser mantidos registos pormenorizados das existências de vírus, bem como das datas e resultados das verificações de controlo da qualidade. Devem igualmente ser mantidos registos dos vírus adicionados às existências, com indicação da fonte, e dos vírus enviados para outros laboratórios.
4. Recomenda-se que a unidade de biossegurança que trabalha com o vírus da PSA seja apoiada por áreas em que o vírus da PSA não seja manuseado. Estas áreas devem estar disponíveis para a preparação de material de vidro e de meios, a manutenção e preparação de culturas de células não infectadas, o processamento de soros e os testes serológicos (excepto no que respeita aos métodos que utilizem o vírus vivo da PSA) e a prestação de apoio administrativo e de secretariado.

Quadro 1

## Princípios de contenção biológica adequados para os laboratórios de diagnóstico

	Requisitos mínimos	Requisitos adicionais
Ambiente geral	Pressão atmosférica normal Salas específicas reservadas a procedimentos bem definidos	Pressão atmosférica normal Filtração HEPA do ar extraído Salas específicas reservadas exclusivamente para procedimentos de diagnóstico da peste suína clássica ou da PSA Tratamento dos efluentes que possam estar contaminados por forma a inactivar o vírus da PSA (calor ou agentes químicos)
Vestuário de laboratório	Vestuário externo específico utilizado apenas na unidade do vírus da PSA Luvas descartáveis para todas as manipulações de materiais infectados Vestuário externo esterilizado antes de ser removido da unidade, ou lavado a altas temperaturas dentro da unidade	Muda completa de roupa à entrada. Vestuário de laboratório utilizado apenas na unidade do vírus da PSA Luvas descartáveis para todas as manipulações de materiais infectados Vestuário esterilizado antes de ser removido da unidade, ou lavado a altas temperaturas dentro da unidade
Controlo do pessoal	Entrada na unidade apenas autorizada a pessoal formado designado Lavagem e desinfecção das mãos à saída da unidade Pessoal não autorizado a visitar instalações com suínos no prazo de 48 horas após a saída da unidade	Entrada na unidade apenas autorizada a pessoal formado designado. Lavagem e desinfecção das mãos à saída da unidade Pessoal não autorizado a visitar instalações com suínos no prazo de 48 horas após a saída da unidade.
Equipamento	Câmara de segurança biológica (classe I ou II) utilizada para todas as manipulações de vírus vivo. A câmara deve dispor de filtração HEPA dupla do ar extraído Na sala laboratorial específica, deve encontrar-se disponível todo o equipamento necessário para procedimentos laboratoriais	

Quadro 2

## Requisitos de biossegurança das salas de animais experimentais

	Requisitos
Ambiente geral	Ventilação controlada por pressão negativa Filtração HEPA do ar extraído Meios para descontaminação/desinfecção completa no final da experiência. Todos os efluentes sólidos e líquidos tratados por forma a inactivar o vírus da PSA (calor/incineração ou agentes químicos)

	Requisitos
Vestuário de laboratório	Muda completa de roupa à entrada Vestuário esterilizado antes de ser removido da unidade, ou lavado a altas temperaturas dentro da unidade
Controlo do pessoal	Entrada na unidade apenas autorizada a pessoal formado designado Vestuário deixado no interior, antes do banho de chuveiro. Banho de chuveiro completo à saída da unidade Pessoal não autorizado a visitar instalações com suínos no prazo de 48 horas após a saída da unidade
Equipamento	Todo o equipamento necessário para procedimentos com animais deve encontrar-se disponível na unidade Todos os materiais devem ser esterilizados à saída da unidade, ou, caso se trate de amostras provenientes de animais, devem ser inseridos num contentor estanque com um duplo invólucro cuja superfície seja desinfectada com vista ao transporte para o laboratório da PSA
Animais	Todos os animais devem ser abatidos antes de saírem da unidade; os exames <i>post mortem</i> devem ser efectuados na área biossegura e as carcaças devem ser incineradas uma vez concluídos os exames