

Decreto 20 maggio 1996 n.51
MISURE DI LOTTA CONTRO L'INFLUENZA AVIARIA.

Noi Capitani Reggenti

la Serenissima Repubblica di San Marino

Visto il Decreto 2 dicembre 1992 n. 98 che dà esecuzione all'Accordo interinale del commercio e unionedoganale del 27 novembre 1992 fra la Repubblica di San Marino e la CEE;

Vista La Legge 17 marzo 1993 n. 41;

Vista la decisione n. 1/94 adottata in data 28 giugno 1994 dal Comitato di Cooperazione San Marino-CEE di cui all'art. 13 dell'Accordo interinale sopra citato;

Visto il Decreto 4 ottobre 1984 n. 87;

Vista la Delibera del Congresso di Stato del 6 maggio 1996 n. 36;

ValendoCi delle Nostre Facoltà;

Decretiamo, promulghiamo e mandiamo a pubblicare:

Art. 1

Il presente Decreto definisce le misure di lotta da applicare in caso di comparsa dell'Influenza Aviaria negli allevamenti di volatili da cortile, in attuazione della direttiva 92/40 del Consiglio del 19/5/92, adottata con decisione n.1/94 del Comitato di Cooperazione San Marino-CEE.

Il presente Decreto non si applica se la malattia viene individuata in altri volatili; tuttavia, in questo caso, la Repubblica di San Marino segnala alla apposita Commissione della CE tutte le misure che ha adottato.

Art. 2

Ai fini del presente Decreto si applicano, se del caso, le definizioni di cui all'articolo 2 del Decreto 20 maggio 1996 n.53, relativa alle norme di polizia sanitaria per gli scambi intracomunitari e le importazioni in provenienza dai paesi terzi di pollame e uova da cova.

Inoltre si intende per:

a) volatile infetto: qualsiasi volatile in cui sia stata ufficialmente confermata la presenza della Influenza Aviaria ai sensi dell'allegato I, a seguito di un esame effettuato da un laboratorio riconosciuto, oppure qualsiasi volatile in cui siano stati constatati, se si tratta di un secondo focolaio o di un focolaio successivo, sintomi clinici o lesioni post mortem propri dell'influenza aviaria;

b) volatile sospetto di infezione: qualsiasi volatile che presenti sintomi clinici o lesioni post mortem tali da indurre ragionevolmente a sospettare la presenza dell'Influenza Aviaria, o qualsiasi volatile in cui sia stata accertata la presenza del virus A dell'influenza, sottotipo H5 o H7;

c) volatile sospetto di contaminazione: qualsiasi volatile che abbia potuto essere esposto, direttamente, al virus dell'Influenza Aviaria, oppure al virus A dell'influenza, sottotipo H5 o H7;

d) autorità competente: il Servizio Veterinario Statale;

e) Veterinario Ufficiale: il veterinario facente parte del Servizio Veterinario Statale.

Art. 3

Il sospetto dell'esistenza di Influenza Aviaria è oggetto di notifica obbligatoria ed immediata all'autorità competente.

Art. 4

1. Qualora in un'azienda siano presenti volatili sospetti di infezione di Influenza Aviaria, il Veterinario Ufficiale applica immediatamente i mezzi ufficiali di investigazione allo scopo di confermare o escludere la presenza della malattia e, in particolare, prelevare o far prelevare i campioni idonei per gli esami di laboratorio.

2. Non appena è notificato un caso sospetto di infezione, la autorità competente pone l'azienda interessata sotto controllo ufficiale e dispone in particolare che:

a) venga compilato un registro di tutte le categorie di volatili presenti nell'azienda specificando, per ciascuna di esse, quanti volatili sono morti, quanti presentano sintomi clinici e quanti non presentano sintomi; il registro dovrà essere aggiornato per tenere conto dei volatili nati e morti nel corso del periodo in cui si sospetta l'infezione; i dati di detto registro dovranno essere tenuti aggiornati, essere presentati su richiesta, e potranno essere controllati in occasione di ciascuna visita.;

b) tutti i volatili presenti nell'azienda siano tenuti nei locali in cui sono allevati o confinati in altri locali in cui possano essere isolati per non essere in contatto con altri volatili;

c) siano proibiti gli spostamenti di volatili provenienti o destinati all'azienda;

d) sia subordinato all'autorizzazione dell'autorità competente:

- qualsiasi movimento di persone, di altri animali e di veicoli in provenienza dall'azienda o a destinazione della stessa;

- qualsiasi movimento di carni o di carcasse di volatili, mangimi, materiale, rifiuti, deiezioni, lettiere, letami e tutto ciò che è suscettibile di trasmettere l'Influenza Aviaria;

e) dall'azienda non siano fatte uscire uova, tranne le uova inviate direttamente in uno stabilimento riconosciuto per la fabbricazione e/o il trattamento degli ovoprodotti conformemente ad un'autorizzazione rilasciata dall'autorità competente. Questa autorizzazione dovrà soddisfare i requisiti dell'allegato I;

f) venga fatto ricorso a mezzi appropriati di disinfezione alle entrate ed alle uscite dei fabbricati in cui sono allevati i volatili, nonché dell'azienda stessa;

g) venga effettuata un'indagine epidemiologica conformemente all'articolo 7.

3. In attesa dell'entrata in vigore delle misure ufficiali, previste al paragrafo 2, il proprietario o il detentore di qualsiasi allevamento di volatili sospetti di infezione si adopera per garantire il rispetto delle disposizioni di cui al paragrafo 2, ad esclusione della lettera g).

4. L'autorità competente può estendere qualsiasi misura di cui al paragrafo 2 ad altre aziende qualora, tenuto conto della ubicazione e della configurazione dei fabbricati o di eventuali contatti con l'azienda nella quale si sospetta la presenza della malattia, vi siano fondati motivi per sospettare un'eventuale contaminazione.

5. Le misure previste ai paragrafi 1 e 2 rimangono applicabili finché la sospetta presenza dell'Influenza Aviaria sia esclusa dal Veterinario Ufficiale.

Art. 5

1. Non appena viene confermata ufficialmente la presenza della Influenza Aviaria in un'azienda, il Servizio Veterinario dispone, oltre all'applicazione delle misure previste all'articolo 4, paragrafo 2:

a) che tutti i volatili presenti nell'azienda siano abbattuti in loco senza indugio. I volatili morti o abbattuti e tutte le uova devono essere distrutti. Queste operazioni devono essere eseguite in modo da ridurre al minimo il rischio di diffusione della malattia;

b) che tutti i materiali o tutti i rifiuti, come il mangime, le lettiere ed il letame, suscettibili di essere contaminati vengano distrutti o sottoposti a trattamento idoneo. Quest'ultimo, eseguito conformemente alle istruzioni del Veterinario Ufficiale, deve garantire la distruzione del virus dell'Influenza Aviaria eventualmente presente;

c) che, qualora i volatili siano stati macellati durante il periodo presunto di incubazione della malattia, le carni da essi ottenute vengano, nella misura del possibile, individuate e distrutte;

d) che le uova da cova deposte durante il presunto periodo di incubazione e uscite dall'azienda siano individuate e distrutte; i pulcini già nati da queste uova devono essere posti sotto sorveglianza ufficiale; le uova da mensa deposte durante il presunto periodo di incubazione e uscite dall'azienda devono, nella misura del possibile, essere individuate e distrutte, a meno che non siano state precedentemente disinfettate in modo corretto;

e) che, ultimate le operazioni di cui alle lettere a) e b), i fabbricati adibiti all'allevamento dei volatili e le loro vicinanze nonché i veicoli usati per il trasporto e qualsiasi materiale suscettibile di essere contaminato vengano puliti e disinfettati;

f) che nell'azienda non vengano introdotti volatili per almeno 21 giorni a decorrere dall'ultimazione delle operazioni di cui alla lettera e);

g) che venga effettuata un'indagine epidemiologica conformemente all'articolo 7.

2. L'autorità competente può estendere le misure di cui al paragrafo 1 ad altre aziende vicine qualora la loro ubicazione, topografia o contatto con l'azienda in cui è stata confermata la presenza della malattia permettano di sospettare un'eventuale contaminazione.

Art. 6

Nel caso di allevamenti costituiti da due o più' branchi separati, l'autorità competente può, derogare ai requisiti dello articolo 5, paragrafo 1, per i branchi sani di un'azienda infetta, a condizione che il Veterinario Ufficiale confermi che le operazioni ivi effettuate lasciano i branchi completamente separati per quanto riguarda la stabulazione, il governo e l'alimentazione, in modo che il virus non può propagarsi da un branco all'altro.

Art. 7

1. L'indagine epidemiologica verte sugli aspetti seguenti:

- la durata del periodo in cui l'Influenza Aviaria può essere stata presente nell'azienda;
- l'origine probabile dell'Influenza Aviaria nell'azienda e la identificazione delle altre aziende i cui volatili possono essere stati infettati o contaminati dalla stessa fonte del virus;
- i movimenti di persone, volatili o altri animali, veicoli, uova, carni o carcasse, nonché qualsiasi materiale o materia suscettibile di aver veicolato il virus dell'influenza aviaria nell'azienda in questione o in provenienza da essa.

2. In base all'articolo 5, del Decreto 4 ottobre 1984 n. 87 il Dirigente del Servizio Igiene Ambientale può proporre l'emissione di ordinanze al fine di mettere in atto tutte le misure necessarie per l'eradicazione dell'Influenza Aviaria. Redige un piano di emergenza nel quale vengono specificate le misure da applicare in caso di emergenza della malattia secondo i criteri figuranti nell'allegato VI.

Art. 8

1. Qualora il Veterinario Ufficiale abbia motivo per sospettare che i volatili di un'azienda possano essere stati contaminati in conseguenza di movimenti di persone, animali o veicoli o in qualsiasi altro modo, l'azienda in questione è sottoposta a controllo ufficiale conformemente al paragrafo 2.

2. Il controllo ufficiale ha lo scopo di individuare immediatamente qualsiasi caso sospetto di Influenza Aviaria, di tenere un registro dei volatili detenuti nell'azienda e di controllarne i movimenti nonché, ove occorra, di prendere le misure elencate al paragrafo 3.

3. Quando un'azienda è sottoposta a controllo ufficiale conformemente ai paragrafi 1 e 2, l'autorità competente vieta l'uscita di volatili dall'azienda tranne per il loro trasferimento diretto in un macello, sotto controllo ufficiale, ai fini della loro immediata macellazione. L'autorizzazione è concessa previa esecuzione, da parte del Veterinario Ufficiale, di un esame clinico dei volatili dal quale risulti l'assenza dell'Influenza Aviaria nell'azienda. Le restrizioni ai movimenti degli animali previste nel presente articolo sono applicate per un periodo di almeno 21 giorni a decorrere dall'ultima data in cui può essersi verificata la contaminazione; tali restrizioni devono comunque essere applicate per un periodo di almeno 7 giorni.

4. Qualora ritenga che le condizioni lo permettono, l'autorità competente può limitare le misure di cui al presente articolo ad una parte dell'azienda ed ai volatili che si trovano in tale parte, a condizione che i volatili in questione siano stati completamente separati dal restante quanto al ricovero, al governo e all'alimentazione e che le relative operazioni siano state eseguite da addetti diversi.

Art. 9

1. Non appena è ufficialmente confermata la presenza della Influenza Aviaria l'autorità competente delimita attorno all'azienda infetta, una zona di protezione di almeno 3 km di raggio, inserita in una zona di sorveglianza da intendersi l'intero territorio della Repubblica di San Marino.

2. Le misure applicate nella zona di protezione comprendono:

- a) l'identificazione di tutte le aziende che detengono volatili, all'interno della zona;

b) visite periodiche di tutte le aziende che detengono volatili, l'esame clinico dei volatili in questione, compresa, ove occorra, la raccolta di campioni da sottoporre ad esami di laboratorio; va tenuto inoltre un registro delle visite e dei risultati degli esami;

c) il sequestro di tutti i volatili nei locali in cui sono allevati o in qualsiasi altro locale in cui possano essere tenuti isolati;

d) il ricorso a mezzi appropriati di disinfezione agli ingressi e alle uscite delle aziende;

e) il controllo dei movimenti degli addetti alla manipolazione dei volatili, delle carcasse di volatili e delle uova, nonché dei veicoli adibiti al trasporto di volatili, di carcasse e di uova all'interno della zona; in linea di massima il trasporto di volatili è vietato, fatta eccezione per il transito sui grandi assi stradali o ferroviari;

f) il divieto di uscita dei volatili e di uova da cova dalla azienda in cui si trovano, tranne qualora l'autorità competente abbia autorizzato il trasporto:

I) di volatili destinati alla macellazione immediata in un macello situato, di preferenza, nella zona infetta o, in casi di impossibilità, in un macello designato dall'autorità competente al di fuori della zona infetta. Le carni di tali volatili devono recare un marchio sanitario speciale, di cui all'apposito Decreto;

II) di pulcini di un giorno o di pollastre pronte per la deposizione in un'azienda situata nella zona di sorveglianza, in cui non sono presenti altri volatili. L'azienda destinataria deve essere sottoposta al controllo ufficiale di cui all'articolo 8, paragrafo 2;

III) di uova da cova in un incubatoio designato dall'autorità competente; prima della spedizione, le uova e gli imballaggi che le contengono devono essere disinfettati. Gli spostamenti previsti ai punti i), ii) e iii) devono essere effettuati direttamente e sotto controllo ufficiale. Essi sono autorizzati soltanto previa esecuzione, da parte del Veterinario Ufficiale, di una ispezione sanitaria dell'azienda. I mezzi di trasporto usati devono essere puliti e disinfettati prima e dopo l'uso;

g) il divieto di spostare o spandere letame o lettiere usate di volatili senza autorizzazione;

h) il divieto di fiere, mercati, esposizioni e altri raduni di volatili o di altri uccelli.

3. Le misure applicate nella zona di protezione restano in vigore per almeno 21 giorni dopo l'esecuzione delle operazioni preliminari di pulizia e di disinfezione dell'azienda infetta. La zona di protezione entra allora a far parte della zona di sorveglianza.

4. Le misure applicate nella zona di sorveglianza comprendono:

a) l'identificazione di tutte le aziende che detengono volatili situate nella zona;

b) il controllo dei movimenti dei volatili e di uova da cova nell'ambito della zona;

c) il divieto di uscita dalla zona dei volatili per i primi 15 giorni, tranne per il trasporto diretto dei volatili ad un macello situato fuori dalla zona di sorveglianza, designato dalla autorità competente. Le carni di tali volatili devono recare il marchio sanitario speciale;

d) il divieto di uscita dalla zona di sorveglianza di uova da cova, tranne per il trasporto ad un incubatoio designato dalla autorità competente. Prima della spedizione le uova e gli imballaggi che le contengono devono essere disinfettati;

- e) il divieto di uscita dalla zona di concime e lettiere usate di volatili;
- f) il divieto di fiere, mercati, esposizioni o altri raduni di volatili o di altri uccelli;
- g) fatte salve le disposizioni di cui alla lettera a) e b), il divieto di trasporto di volatili, fatta eccezione per il transito sui grandi assi stradali o ferroviari.

5. Le misure applicate nella zona di sorveglianza restano in vigore per almeno 30 giorni dopo l'esecuzione delle operazioni preliminari di pulizia e di disinfezione dell'azienda infetta.

Art. 10

La raccolta dei campioni e gli esami di laboratorio volti ad accertare la presenza del virus dell'Influenza Aviaria devono essere effettuati conformemente all'allegato III.

Art. 11

La Repubblica di San Marino designa, quale suo laboratorio di referenza, il laboratorio della Repubblica Italiana figurante nell'allegato IV del presente Decreto.

Art. 12

Il laboratorio comunitario di riferimento per l'Influenza Aviaria è indicato nell'allegato V. Le competenze ed i compiti di questo laboratorio sono quelli che figurano nell'allegato.

Art. 13

La vaccinazione contro l'Influenza Aviaria mediante vaccini autorizzati dall'autorità competente può essere applicata soltanto per integrare le misure di lotta prese al momento della comparsa della malattia e conformemente alle disposizioni seguenti:

- a) la decisione di introdurre la vaccinazione per integrare le misure di lotta viene presa, in collaborazione con la Repubblica di San Marino, dalla Commissione secondo le procedure previste.

Tale decisione tiene conto dei criteri seguenti:

- la concentrazione dei volatili nella zona colpita,
- le caratteristiche e la composizione di ciascun vaccino utilizzato,
- le modalità di controllo della distribuzione, dell'ammasso e dell'impiego dei vaccini,
- le specie e le categorie di volatili che possono o devono essere sottoposti a vaccinazione,
- le zone in cui può e deve essere eseguita la vaccinazione.

Tuttavia in deroga al primo comma, la Repubblica di San Marino può, previa notifica alla Commissione, prendere la decisione di effettuare la vaccinazione d'emergenza intorno ad un focolaio, purché non siano pregiudicati gli interessi fondamentali della Comunità.

- b) Qualora la Repubblica di San Marino venga autorizzata, a norma della lettera a), ad effettuare la vaccinazione d'emergenza in una parte delimitata dal proprio territorio, tale misura non modifica la qualifica del territorio restante purché le misure di immobilizzazione

degli animali vaccinati restino in vigore per un periodo da determinare secondo la procedura comunitaria prevista.

Art. 14

1. Nella misura in cui ciò sia necessario all'applicazione uniforme del presente Decreto, ed in collaborazione con le autorità competenti, gli esperti della Commissione possono effettuare controlli in loco. A tal fine, essi possono verificare, controllando una percentuale rappresentativa di stabilimenti se le autorità competenti controllano il rispetto del presente Decreto da parte di detti stabilimenti. La Commissione informa gli Stati membri del risultato dei controlli effettuati.

2. La Repubblica di San Marino sul cui territorio viene effettuato un controllo presta tutta l'assistenza necessaria affinché gli esperti possano espletare le loro mansioni.

Art. 15

Gli allegati saranno modificati, se necessario, su proposta del Servizio Veterinario, in particolare per tenere conto della evoluzione delle ricerche e delle procedure di diagnosi.

Art. 16

Chiunque a qualsiasi titolo contravvenga alle norme del presente Decreto, sarà punito con ammenda da £. 100.000 a £. 500.000, salvo che il fatto non costituisca piu' grave reato.

Dato dalla Nostra Residenza, addì 20 maggio 1996/1695 d.F.R.

I CAPITANI REGGENTI

Pier Paolo Gasperoni - Pietro Bugli

IL SEGRETARIO DI STATO

PER GLI AFFARI INTERNI

Antonio Lazzaro Volpinari

ALLEGATO I

AUTORIZZAZIONE A FAR USCIRE UOVA DALL'AZIENDA CONFORMEMENTE ALL'ARTICOLO 4, PARAGRAFO 2, LETTERA e) DEL PRESENTE DECRETO

L'autorizzazione rilasciata dall'autorità competente ai fini del trasporto delle uova da un'azienda sospetta soggetta alle disposizioni dell'articolo 4, paragrafo 2, lettera e) verso uno stabilimento riconosciuto per la fabbricazione ed il trattamento di ovoprodotti di seguito denominato "stabilimento designato", dovrà rispettare le seguenti condizioni:

1. per poter lasciare l'azienda sospetta le uova dovranno:

a) soddisfare i requisiti dell'allegato, capitolo IV del Decreto sugli ovoprodotti;

b) essere inviate direttamente dall'azienda sospetta allo stabilimento designato: ogni spedizione dovrà essere sigillata prima della partenza dal Veterinario Ufficiale dell'azienda

sospetta e dovrà restare sigillata per tutta la durata del trasporto fino allo stabilimento designato;

2. il Veterinario Ufficiale dell'azienda sospetta informa l'autorità competente dello stabilimento designato dell'intenzione di inviargli delle uova;

3. l'autorità competente responsabile dello stabilimento designato si assicurerà che:

a) le uova di cui al punto 1, lettera b) siano contenute isolate dalle altre uova dal momento del loro arrivo fino a quando non siano trattate;

b) i gusci di tali uova siano considerati materiali ad alto rischio e siano trattati conformemente ai requisiti previsti dallo specifico Decreto;

c) il materiale d'imballaggio, i veicoli utilizzati per il trasporto delle uova di cui al punto 1), lettera b), nonché tutti i luoghi con cui le uova sono entrate in contatto siano puliti e disinfettati in modo tale che qualsiasi virus della malattia di Newcastle sia distrutto;

d) il Veterinario Ufficiale dell'azienda sospetta sia informato di qualsiasi spedizione di uova trattate.

ALLEGATO II PROCEDURA PER LA PULIZIA E LA DISINFEZIONE DI UNA AZIENDA INFETTA

I) Pulizia e disinfezione preliminari

a) Non appena le carcasse dei volatili siano state rimosse per essere distrutte, quelle parti dei locali in cui sono allevati i volatili e qualsiasi parte di edifici, cortili, ecc. contaminati durante l'abbattimento o l'ispezione post mortem devono essere irrorati con disinfettanti approvati conformemente all'articolo 11 del presente decreto.

b) Qualsiasi tessuto di volatili e uova che avrebbero potuto contaminare gli edifici, i cortili, gli utensili ecc. deve essere accuratamente recuperato ed eliminato con le carcasse.

c) Il disinfettante utilizzato deve rimanere sulla superficie trattata per almeno 24 ore.

II) Pulizia e disinfezione finale

a) Il grasso ed il sudiciume devono essere eliminati da tutte le superfici con l'applicazione di un prodotto sgrassante e successivamente lavate con acqua.

b) Una volta lavate con acqua come indicato alla lettera a), le superfici di cui sopra devono essere irrorate di nuovo con un disinfettante.

c) Dopo sette giorni i locali devono essere trattati con un prodotto sgrassante, sciacquati con acqua fredda, irrorati con un disinfettante e nuovamente sciacquati con acqua.

d) Il concime e le lettiere usate devono essere trattati con un metodo atto ad uccidere il virus. Questo metodo deve comprendere una delle procedure seguenti:

I) essere bruciati o sottoposti a vapore ad una temperatura di 70° C;

II) essere seppelliti ad una profondità tale da impedirne l'accesso ai parassiti agli uccelli selvatici;

III) essere accumulati ed inumiditi (se necessario per facilitare la fermentazione), coperti per mantenere il calore in modo tale che raggiungano una temperatura di 20° C, e rimanere coperti per 42 giorni in maniera da impedirne l'accesso ai parassiti ed agli uccelli selvatici.

ALLEGATO III METODI DIAGNOSTICI PER LA CONFERMA E LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELL'INFLUENZA AVIARIA

I metodi per isolare e individuare i virus dell'influenza aviaria, descritti qui di seguito, devono essere considerati come orientamenti e criteri minimi da applicare nella diagnosi della malattia.

Ai fini dei metodi diagnostici per la conferma e la diagnosi differenziale dell'influenza aviaria si applica la definizione seguente:

per "influenza aviaria", si intende un'infezione dei volatili causata da qualsiasi virus A dell'influenza avente un indice di patogenicità intravenosa superiore a 1.2 nel pulcini di sei settimane, ovvero qualsiasi infezione provocata da virus A dell'influenza sottotipo H5 o H7, per il quale il sequenziamento dei nucleotidi abbia rilevato la presenza di molteplici amminoacidi basici nel sito di clivaggio dell'emoagglutinina.

CAPITOLO 1

Campionature e trattamento dei campioni

1. Campioni

Frammenti prelevati mediante tampone nell'intestino (o feci) e nella trachea di volatili malati; feci o contenuti degli organi (intestino, tessuti cerebrali, trachea, polmoni, fegato, milza e altri dell'animale malato, prelevati da volatili morti di recente.

2. Trattamento dei campioni

Gli organi e i tessuti menzionati al paragrafo 1 sopra elencati possono essere trattati insieme, salvo per quanto riguarda le feci, per le quali è essenziale un trattamento separato. I materiali prelevati devono essere immersi completamente in un quantitativo sufficiente di antibiotico. I campioni di feci e gli organi devono essere omogeneizzati (in un miscelatore chiuso o in un mortaio con pestello e sabbia sterile) in un mezzo antibiotico e portati in sospensione in tale mezzo al 10-20% p/v. Le sospensioni devono essere lasciate riposare per circa due ore a temperatura ambiente (o per un intervallo superiore a 4°C) e successivamente chiarificati mediante centrifugazione (ad esempio da 800 a 1000% g per 10 minuti).

3. Mezzo antibiotico

Numerosi laboratori hanno utilizzato con successo mezzi antibiotici di varia composizione e i laboratori nazionali potranno essere consultati in proposito nei rispettivi paesi. Per i campioni di feci occorre un'elevata concentrazione di antibiotici, una miscela tipica è la seguente: 10 000 unità/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomina, 0.25 mg/ml di gentamicina 5000 unità/ml di micostatina in una soluzione salina tampone di fosfato. Queste dosi possono essere ridotte fino a 5 volte per i tessuti e i prelievi di trachea. Per l'accertamento della Clamidia, si possono aggiungere 50 mg/ml di ossitetraclina. Nella preparazione del mezzo antibiotico, occorre assolutamente controllare il pH dopo l'aggiunta degli antibiotici e portarlo ad un valore compreso tra 7,0 e 7,4.

CAPITOLO 2

Isolamento del virus

Isolamento del virus nelle uova embrionate di galline

Inoculare 0.1 -0.2 ml del liquido soprannatante chiarificato nella cavità allantoica di almeno 4 uova embrionate di gallina previamente sottoposte a incubazione per 5-10 giorni. Idealmente si dovrebbero utilizzare uova provenienti da un branco indenne da organismi patogeni specifici, ma, in caso di impossibilità, si possono utilizzare uova provenienti da un branco in cui sia comprovata l'assenza di anticorpi dell'influenza aviaria. Le uova inoculate sono mantenute alla temperatura di 37°C ed esaminate ogni giorno in controluce. Le uova in cui si constata che l'embrione è morto o è morente nonché tutte le uova restanti 6 giorni dopo l'inoculazione vengono refrigerate a -4° C e il liquido allantoico/amniotico sottoposto alla prova dell'attività emoagglutinante. Qualora non si constati emoagglutinazione, il procedimento sopra descritto deve essere ripetuto inoculando nelle uova liquido allantoico/amniotico non diluito.

Quando viene constatata emoagglutinazione, la presenza di batteri deve essere esclusa mediante coltura. In caso di presenza di batteri, far passare i liquidi attraverso un filtro a membrana di 450 nm, quindi aggiungere altri antibiotici e procedere nuovamente, come indicato sopra, alla inoculazione in uova embrionate.

CAPITOLO 3

Diagnosi differenziale

1. Differenziazione preliminare

Data l'importanza di porre in atto al più presto possibile provvedimenti volti a limitare la propagazione del virus, ciascun laboratorio regionale dovrebbe essere in grado di identificare qualsiasi virus isolato che provoca emoagglutinazione, come il virus dell'influenza di sottotipo H5 o H7, oltre al virus della malattia di Newcastle. Occorre pertanto utilizzare i liquidi emoagglutinanti eseguendo una prova di inibizione dell'emoagglutinazione come descritto ai capitoli 5 e 6. Una inibizione positiva, cioè pari a 24 o più, con l'antisiero policlonale specifico dei sottotipi H5 o H7, dell'influenza A ed avente un titolo noto, pari almeno a 2° potrà servire per una identificazione preliminare sulla cui base istruire misure provvisorie di contenimento.

Identificazione di conferma

Dal momento che esistono 13 sottotipi di emoagglutinina e 9 sottotipi di neuramnidasi del virus dell'influenza, con varianti all'interno di ciascuno di essi, non è pratico né economicamente fattibile, per i singoli laboratori nazionali, conservare antisieri che consentano di effettuare una caratterizzazione antigenica completa degli isolati d'influenza. Nondimeno, ciascun laboratorio nazionale è tenuto a:

I) confermare che l'isolato è un virus A dell'influenza, mediante prova di doppia immunodiffusione atta a rivelare l'antigene del gruppo, secondo il procedimento indicato al capitolo 9 (si possono impiegare altresì, secondo le preferenze del laboratorio nazionale, le tecniche di immunofluorescenza o ELISA);

II) determinare se l'isolato appartiene al sottotipo H5 o H7;

III) eseguire una prova dell'indice di patogenicità intravenosa su pulcini di sei settimane secondo il procedimento indicato al capitolo 7, indici di patogenicità intravenosa superiori a 1,2 denotano la presenza di virus e richiedono quindi la gamma completa delle misure

profilattiche (è utile che i laboratori nazionali eseguano prove anche per determinare l'attitudine di un isolato a produrre placche nelle colture di cellule, come specificato al capitolo 8).

I laboratori nazionali devono trasmettere immediatamente al laboratorio comunitario di riferimento. per una caratterizzazione completa, tutti gli isolati di influenza aviaria e di virus H5 e H7.

3.-Altre prove di individuazione del tipo e delle caratteristiche degli isolati
il laboratorio comunitario di riferimento dovrebbe ricevere tutti i virus emoagglutinanti dei laboratori nazionali da sottoporre ad ulteriori esami antigenici e genetici. ai fini di una maggiore comprensione dell'epidemiologia della o delle malattie nella Comunità, conformemente alle competenze ed ai compiti del laboratorio comunitario di riferimento.

Oltre a queste funzioni, il laboratorio comunitario di riferimento effettua una tipizzazione antigenica completa di tutti i virus dell'influenza ricevuti. Per i virus H5 e H7 con indici di patogenicità intravenosa non superiori a 1,2 si dovrebbe effettuare altresì un sequenziamento dei nucleotidi del gene dell'emoagglutinina per determinare la presenza di amminoacidi basici multipli nel sito di clivaggio della proteina dell'emoagglutinina.

Virus dotati di amminoacidi basici multipli nel sito del clivaggio, anche se presentano deboli indici di patogenicità, richiedono la piena applicazione delle misure di lotta contro l'influenza aviaria.

CAPITOLO 4

Prove sierologiche per individuare gli anticorpi dei virus dell'influenza aviaria

1. Nei programmi di eradicazione in cui è noto il sottotipo H dei virus. oppure se si usa come antigene il virus omologo, il monitoraggio sierologico per la rivelazione dell'infezione può essere effettuato mediante le prove d'inibizione dell'emoagglutinazione secondo il procedimento indicato ai capitoli 5 e 6.

Se il sottotipo di emoagglutinina non è noto, l'infezione da virus A dell'influenza può essere dimostrata mediante la rivelazione di anticorpi contro gli antigeni specifici del gruppo.

A questo scopo si può ricorrere alla prova di doppia immunodiffusione (descritta al capitolo 9) oppure alla prova ELISA (che presenta peraltro il problema di essere specifica all'ospite, in quanto dipende dalla rivelazione delle immunoglobuline dell'ospite). La prova di doppia immunodiffusione dà raramente risultati positivi negli uccelli acquatici, tranne quando è noto il sottotipo: si può quindi utilizzare su questo tipo di volatili soltanto per la ricerca di anticorpi dei sottotipi H5 e H7.

2. a) Campioni

Prelevare campioni di sangue da tutti i volatili, se il branco è costituito da meno di 20 capi, e da 20 esemplari in caso di branchi più numerosi (si ha in tal modo una probabilità superiore al 99% di individuare almeno un caso sieropositivo se almeno il 25% degli individui del branco è positivo, indipendentemente dalle dimensioni del branco stesso). Lasciar coagulare il sangue e asportare il siero da sottoporre alla prova.

b) Ricerca degli anticorpi

Verificare la capacità di singoli campioni di siero di inibire l'antigene emoagglutinante del virus dell'influenza, mediante prove standard di inibizione dell'emoagglutinazione come indicato nel capitolo 6.

Un aspetto discusso è se nella prova di inibizione dell'emoagglutinante occorra usare 4 o 8 unità di emoagglutinina. Entrambe le ipotesi sembrano valide; la scelta deve essere quindi lasciata a discrezione del laboratori nazionali.

Tuttavia l'antigene usato incide sul livello al quale un siero è considerato positivo: usando 4 unità di emoagglutinina, un siero è considerato positivo se rivela un titolo uguale o superiore a 24 ; usando 8 unità di emoagglutinina, un siero è considerato positivo se rivela un titolo uguale o superiore a 23.

CAPITOLO 5

Prova di emoagglutinazione (HA)

Reagenti

1. Soluzione salina isotonica tamponata con fosfato (SPT) (0,05M) al pH compreso tra 7,0 e 7,4.
2. Prelevare globuli rossi da almeno 3 volatili esenti da organismi patogeni specifici (in caso di impossibilità il sangue può essere prelevato da volatili che sono regolarmente sottoposti a controllo e che non presentano anticorpi dell'influenza aviaria), raggrupparli e aggiungerli ad un volume uguale di soluzione di Alsever. Prima dell'uso, i globuli rossi devono essere lavati 3 volte in soluzione salina tamponata con fosfato. Per l'esecuzione della prova si raccomanda una sospensione all'1 % (globuli confezionati v/v) in soluzione salina tamponata.
3. Il laboratorio comunitario di riferimento fornirà o raccomanderà, come antigene standard, i virus H5 e H7 a bassa virulenza.

Procedimento

1. Porre 0.025 ml di soluzione in ciascuno dei pozzetti di una piastra di microtitolazione in materiale plastico (usare pozzetti a V).
2. Versare 0.025 ml di sospensione del virus (ad esempio liquido allantoico) nel primo pozzetto.
3. Usare un diluente da microtitolazione per raddoppiare la diluizione (da 1/2 a 1/4096) di virus nella piastra.
4. Aggiungere altri 0,025 ml di soluzione salina in ogni pozzetto.
5. Aggiungere 0.025 ml di globuli rossi all'1 % in ogni pozzetto.
6. Mescolare agitando leggermente e porre a riposo alla temperatura di 4°C.
7. La lettura viene effettuata 30-40 minuti dopo, una volta stabilizzati i globuli rossi di controllo. La lettura si effettua inclinando la piastra ed osservando la presenza o l'assenza di globuli rossi raggruppati a forma di goccia. Il flusso nei pozzetti che non presentano emoagglutinazione deve essere identico a quello constatato presso i globuli rossi di controllo esenti dal virus.
8. Il titolo di emoagglutinazione è costituito dalla diluizione più elevata che provoca agglutinazione dei globuli rossi. Tale diluizione può essere considerata come contenente una unità emoagglutinante (HAU). Un metodo più accurato per la determinazione del titolo di emoagglutinazione consiste nell'effettuare prove di agglutinazione sul virus in una serie di diluizioni iniziali progressive, ad esempio 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, ecc. Si raccomanda questa

procedura per una preparazione accurata dell'antigene per le prove di inibizione dell'emoagglutinazione (capitolo 6).

CAPITOLO 6

Prova di inibizione dell'emoagglutinazione

Reagenti

1. Soluzione salina tamponata con fosfato (SPT).
2. Liquido allantoico contenente il virus, diluito nella soluzione salina in modo da avere un contenuto di 4 o 8 unità di emoagglutinazione per 0.025 ml.
3. Globuli rossi di pollame: 1%
4. Siero di pollame negativo di controllo.
5. Siero positivo di controllo.

Procedimento

1. Versare 0,025 ml di soluzione salina tamponata con fosfato in tutti i pozzetti di una piastra di microtitolazione in materiale plastico (i pozzetti devono avere una forma a V
2. Versare 0,025 ml di siero nel primo pozzetto della piastra.
3. Usare un diluente da microtitolazione per ottenere una diluizione di 1/2 di siero sulla piastra.
4. Aggiungere 0,025 ml di liquido allantoico diluito contenente 4 o 8 unità di emoagglutinazione.
5. Mescolare picchiettando leggermente e conservare alla temperatura di -4° C per almeno 60 minuti o a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
6. Aggiungere 0,025 ml di globuli rossi all' 1% in tutti i pozzetti.
7. Mescolare picchiettando leggermente e porre a riposo alla temperatura di 4°C.
8. La lettura delle piastre è effettuata dopo 30-40 minuti, dopo che i globuli rossi di controllo si sono stabilizzati. La lettura viene effettuata inclinando la piastra e osservando se nel flusso del liquido v'è o meno formazione di gocce in misura uguale a quelle dei pozzetti di controllo che contengono unicamente globuli rossi (0,025 ml) e soluzione salina (0,05 ml).
9. Il titolo di inibizione dell'emoagglutinazione è costituito dalla diluizione massima di antisiero che comporta una inibizione totale di 4 o 8 unità di virus (ciascuna prova dovrebbe comprendere una titolazione di emoagglutinazione a scopo di conferma della presenza delle unità di agglutinazione richieste).
10. I risultati sono validi se si ottiene un titolo inferiore a 23 per 4 unità di agglutinazione o 22 per 8 unità di agglutinazione con il siero negativo di controllo ed un titolo inferiore o uguale a 1 con una diluizione del siero di controllo positivo del titolo noto.

CAPITOLO 7

Prova dell'indice di patogenicità endovenosa (IVPI)

1. Diluire da 10⁻¹ in una soluzione isotonica salina sterile, liquido allantoico infetto prelevato dall'ultimo livello di passaggio disponibile, preferibilmente dall'isolamento iniziale senza selezione.
2. Iniettare per via endovenosa 0,1 ml di virus diluito in dieci pulcini di sei settimane (deve trattarsi di animali esenti dallo specifico patogeno).
3. Esaminare i pulcini per 10 giorni ad intervalli di 24 ore.
4. Classificare ognuno dei pulcini ad ogni osservazione nel modo seguente: 0 = normale; 1 = malato; 2= gravemente malato; 3 = morto.
5. L'indice è calcolato come nell' esempio che segue:

Sintomi clinici Giorni successivi all'inoculazione Totale punteggio

12345678910

normale 1020000000012 x 0 = 0

malato 04200000006 x 1 = 6

gravemente malato 02220000006 x 2 = 12

morto 026810101010101076 x 3 = 228

Totale = 246

L indice è costituito dal punteggio medio per pulcino per ogni osservazione ossia a 246 = 2,46.

100

Deve trattarsi di un giudizio clinico soggettivo; in questo caso, tuttavia, i volatili presentano generalmente uno o piu' dei sintomi -

seguenti: complicazioni respiratorie, depressione, diarrea, cianosi dell'epidermide o del bargiglio, edema facciale o cranico, sintomi

neuropatologici.

CAPITOLO 8

Valutazione della capacità di formazione di placca

1. Il procedimento migliore consiste nell'utilizzare tutta una gamma di diluizioni di virus per essere certi di disporre sulla piastra dei numeri ottimali di placche. Dieci diluizioni fino a 10⁻² in soluzione salina fosfatata dovrebbero essere sufficienti.

2. Monostrati confluenti di cellule di embrione di volatile o una linea cellulare adeguata (ad esempio rene bovino Madin-Darby) sono preparati e disposti in scatole di Petri aventi 5 cm di diametro.
3. Aggiungere in due scatole di Petri 0.2 ml di ciascuna delle diluizioni di virus e lasciar assorbire il virus per 30 minuti.
4. Lavare 3 volte con la soluzione salina le cellule infette, indi ricoprirle con il mezzo pertinente, contenente l'1 % pv di agar e 0,01 mg/ml di tripsina, oppure non contenente tripsina; è importante non aggiungere siero al mezzo di copertura.
5. Dopo una incubazione a 37°C per 72 ore, le placche dovrebbero avere una dimensione sufficiente. Per una migliore osservazione delle placche, asportare lo strato di agar di copertura e colorare il monostrato cellulare con cristalvioletto (0.5 % p/v) in metanolo al 25 % v/v.
6. Tutti i virus dovrebbero fornire placche evidenti, se incubati alla presenza di tripsina nello strato di copertura. Se nel mezzo di copertura non vi è tripsina, soltanto i virus virulenti per i volatili producono placche.

CAPITOLO 9

Immunodiffusione doppia

Il metodo raccomandato, per rivelare la presenza del virus A dell'influenza consiste nell'individuare gli antigeni del nucleocapside o della matrice, che sono comuni a tutti i virus A dell'influenza. A ciò si perviene generalmente mediante le prove di immunodiffusione doppia, utilizzando preparazioni di virus concentrati o estratti di membrana corio-allantoidea infetta.

Idonei preparati di virus concentrati si possono ottenere semplicemente centrifugando ad alta velocità liquido allantoico infetto e sottoponendolo ad un trattamento a base di detergente lauroilsarcosinato di sodio, in modo che dal frazionamento del virus siano liberati gli antigeni che si trovano all'interno del nucleocapside e della matrice. Si può usare anche un precipitante acido, aggiungendo al liquido allantoico HCL 1N, per ottenere un pH finale compreso tra 3,5 e 4,0, refrigerando per circa un'ora a 0° C e centrifugando a bassa velocità (1 000 g) per 10 minuti.

Il liquido supernatante può essere eliminato ed il precipitato contenente il virus può essere rimesso in sospensione in un volume minimo di tampone glicina-sarcosile (lauroilsarcosinato di sodio all'1 % tamponato con glicina 0,5 M, fino ad ottenere un pH di 9.0). Queste preparazioni possiedono antigeni sia del nucleocapside che della matrice.

Beard (1970) ha descritto la preparazione di antigeni ricchi di nucleocapside ottenuti dalle membrane corio-allantoiche prelevate da uova infette. Il procedimento si svolge come segue: si estraggono le membrane corio-allantoiche dalle uova infette con emoagglutinina positiva; si frantumano od omogeneizzano le membrane; si congela e sgela tre volte, centrifugando quindi per 10 minuti a 1 000 g; si elimina il deposito formatosi e si tratta il liquido supernatante con formalina allo 0,1 % per utilizzarlo come antigene.

Entrambi questi antigeni possono essere utilizzati per la prova di immunodiffusione doppia, con 1% di agarosio o di agar o gel contenenti cloruro di sodio all'8 % portato a molarità di 0.1 M con tampone fosfato a pH 7,2. Il virus A dell'influenza è confermato dalle linee di precipitina formate dall'antigene di prova e dall'antigene positivo noto, prendendo come

termine di riferimento un antisiero positivo noto che, coalescendo, producono una linea d'identità.

ALLEGATO IV
ELENCO DEI LABORATORI NAZIONALI PER L'INFLUENZA AVIARIA

Belgio Institut National de Recherches Vétérinaires

Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles

Danimarca National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division

Hangovej 2, DK-8200 Aarhus N

Germania Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft

Braunschweig- Volkenrode, Postfach 280, D-3100 Celle

Francia Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires - Laboratoire Central de Recherches Agricoles et Porcines

B.P. 53, F-22440 Ploufragan

Grecia Institut des Maladies infectieuses et parasitaires

66, rue du 26 octobre, 54627-Thessaloniki

Irlanda Veterinary Research Laboratory

Abbotstown, Castleknock, Dublin 15

Italia Istituto Patologie Aviarie, Facoltà di medicina veterinaria, Università di Napoli

Via Aniezzo, Falcone 334, I-80127 Napoli F Delpino 1

Lussemburgo Institut National de Recherches Veterinaires

Groeselenberg 99, B 1180 Bruxelles

Paesi Bassi Central Diergeneeskundig Institut, Vestiging Virologie

Houtibweg 39, NL-8221 RA Lelystad

Portogallo Laboratorio Nacional de Investigacao Veterinaria (LNIV)

Estrada de Benfca 701, 1500 Lisboa

Spagna Centro Nacional de Referencia para la Peste Aviar - Laboratorio Nacional de Sanidad y Produccion Animal de Barcelona

Zona Franca Circunvalacion-Tramo 6, Esquina Calle 3. Barcelona

Regno Unito Central Veterinary Laboratory

New Haw, Weybridge, GB-Surrey KT 15 3 NB

Repubblica di San Marino Istituto Patologie Aviarie, Facoltà di medicina veterinaria, Università di Napoli

Via Aniezzo, Falcone 334, I-80127 Napoli F Delpino I