Allegato B

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA

Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi

Sorveglianza Epidemiologica della Lombardia

MANUALE OPERATIVO IN CASO DI MALATTIA EMORRAGICA VIRALE (MEV/RHD)

INDICE

A. PREMESSA
Descrizione malattia
- *Definizione*
- *Eziologia*
- *Specie sensibili*
- *Proprietà e resistenza del virus*
- *Epidemiologia*
- *Sintomatologia*
- *Lesioni*
- *Patogenesi*
- *Diagnosi*
- *Immunità e diagnosi sierologica*
- *Controllo e profilassi*

Norme e testi di riferimento
Siti web di riferimento

B. DIAGRAMMI DI FLUSSO
1. Attività da svolgere in caso di sospetto
2. Attività da svolgere dopo la conferma

C. PROCEDURE DA ESEGUIRE IN RELAZIONE ALLE DISPOSIZIONI PREVISTE DAL PROVVEDIMENTO ….
1. Sospetto focolaio
   1.1 Segnalazione
   1.2 Accesso, visita ed indagine in azienda
      1.2.1 Indagine clinica
      1.2.2 Modalità di prelievo e di trasporto dei campioni
   1.3 Infondatezza del sospetto
   1.4 Uscita dall'azienda sospetta infetta; provvedimenti in attesa di conferma
2. Conferma focolaio
   2.1 Definizione di positività
   2.2 Indagine epidemiologica
   2.3 Ulteriori procedure da attuare a seguito di conferma di focolaio
      2.3.1 Vaccinazione
      2.3.2 Biosicurezza e sorveglianza in allevamento
      2.3.3 Biosicurezza e sorveglianza epidemiologica
3. Chiusura del focolaio
4. Sorveglianza dopo la chiusura del focolaio
5. Sorveglianza popolazione selvatica

ALLEGATI
1) Scheda di accompagnamento campioni
   a. Conigli allevati
   b. Conigli selvatici
2) Scheda di indagine epidemiologica
3) Attestazione sanitaria integrativa per l'esportazione extracomunitaria
4) Certificato per prodotti non commestibili di origine animali destinati all'esportazione
5) Linee guida per la pulizia e le disinfezioni in allevamento

A. PREMESSA

La MEV/RHDV è una delle due malattie dei lagomorfi notificabili all'OIE. Nel predisporre le norme e raccomandazioni da adottare in caso di focolaio di MEV/RHD bisogna necessariamente tenere conto delle relative indicazioni riportate nel *OIE's Terrestrial Manual* (capitolo 2.6.2), capitolo nel quale sono fornite anche le linee guida per una corretta vaccinazione.

"In countries where RHD is endemic, indirect control of the disease in farmed animals and pet rabbits is achieved by vaccination using the appropriate type of vaccine – one that is prepared from clarified liver suspension of experimentally infected rabbits, and that is subsequently inactivated and adjuvanted. The methods of inactivation (formaldehyde, beta-propiolactone or other substances) and the adjuvants used (incomplete mineral oil or aluminium hydroxide), can vary according to the protocol used by the different manufacturers".

……

"Following an outbreak of RHD, even if strict hygiene and sanitary measures are adopted, including cleaning and disinfection, safe disposal of carcasses and an interval before restocking, it is strongly recommended to vaccinate meat animals at the age of 40 days, because the incidence of re-infection is very high. Only after several production cycles is it advisable to stop vaccination of meat animals. To verify the persistence of infective RHD inside the unit, a variable number of rabbits, starting with a small sentinel group, should not be vaccinated".

……

"Given that immunity starts after about 7–10 days, vaccination could also be considered a quite effective post-exposure treatment. In some situations in particular it may be included in the emergency strategies applied when RHD occurs on those farms having separate sheds and where good biosecurity measures are regularly applied".

Per quanto riguarda il commercio di animali e loro prodotti commestibili e non commestibili, vanno garantite le misure sanitarie previste dal *O.I.E's Terrestrial Animal Health Code* (capitolo 13.2.13).

Descrizione malattia

Malattia Emorragica Virale / Rabbit Haemorrhagic Disease

Definizione

La malattia emorragica virale del coniglio (MEV/RHD) è una patologia altamente contagiosa e letale dei conigli domestici e selvatici. Segnalata e descritta per la prima volta nel 1984 nella Repubblica Popolare Cinese, è in seguito comparsa nell'Est asiatico (1985-86), Italia (fine 1986), Europa continentale (1987-90), America Centrale (Messico 1988, Cuba 1994), Africa settentrionale ed Isole dell'Oceano Indiano (1988-89), Medio-Oriente (1990), Gran Bretagna (1992), Oceania (1995), Stati Uniti, Sud America (2004-2005) e Canada (2011). Attualmente risulta segnalata in più di 40 Paesi ed è considerata enzootica in Europa ed in tutto il bacino del Mediterraneo. Il ceppo RHDV2 segnalato per la prima volta in Francia nel 2010 (vedi oltre) è stato ad oggi identificato in Francia, Italia, Spagna, Malta e Portogallo.

Eziologia

L'agente eziologico della MEV/RHD (RHDV) è classificato come genere lagovirus nella famiglia Caliciviridae: è un virus icosaedrico privo di envelope con un genoma a RNA a polarità positiva di 7.437 basi. Tra le caratteristiche peculiari di RHDV si annoverano: la capacità emoagglutinante nei confronti dei globuli rossi umani di tipo O, l'elevata resistenza ambientale e a trattamenti inattivanti, l'incapacità di crescita *in vitro* e di replicazione su uovo embrionato, come pure la refrattarietà all'infezione di tutte le altre specie animali testate, mammiferi e non, di laboratorio, selvatiche e domestiche.

Come la maggior parte dei virus a RNA, anche RHDV è provvisto di una consistente variabilità genetica, che a sua volta può comportare una variabilità antigenica, favorita dall'ampia e rapida

diffusione dell'infezione virale a livello mondiale. Nonostante questo, dal 1984, anno della prima identificazione, fino al 1996 tutti i ceppi virali isolati nei diversi Paesi sono risultati antigenicamente e geneticamente molto simili tra loro. Da allora, sono stati isolati dei ceppi "varianti" che, conservando la stessa patogenicità, presentavano delle caratteristiche emoagglutinanti (ceppi HA-) e antigeniche differenti (RHDVa), ma non al punto da essere classificati come sierotipi differenti. Infatti, queste varianti conservavano una buona correlazione sierologica con i ceppi classici e una discreta protezione indotta dalla vaccinazione con tali ceppi "classici".
La convinzione dell'esistenza di un solo sierotipo virulento di RHDV, derivante come detto dal confronto antigenico e genomico fra i diversi stipiti isolati in oltre 25 anni dalla primitiva comparsa della malattia, è stata messa in discussione dall'identificazione in Francia, nell'estate 2010 dapprima in conigli selvatici e successiva anche in allevamenti industriali, di un ceppo avente caratteristiche significativamente differenti dai ceppi patogeni conosciuti.
In effetti, RHDVFra10 è un nuovo ceppo, originatosi verosimilmente in modo indipendente dai ceppi RHDV "classici" (RHDVBs89 – tipo originario europeo, e l'RHDVa, suo sottotipo), dotato di caratteristiche cliniche peculiari se confrontate con quanto fino ad oggi osservato in corso di RHD, quali capacità di indurre malattia in soggetti all'ingrasso e in conigli lattanti di 15-20gg, oltre che in riproduttori, anche vaccinati verso i ceppi classici, e tassi di mortalità più bassi ma variabili (5-30%), sia tra selvatici che in aziende industriali. Le analisi di laboratorio hanno confermato la significativa differenza del nuovo virus RHDVFra2010, per il quale appare giustificata la denominazione "RHDV2", da quelli circolanti all'oggi sul territorio. Differenza che è sia genetica, l'identità aminoacidica è circa del 89,2% verso RHDV-RHDVa, e 76,7% verso EBHSV, che antigenica sulla base del profilo di reazione con un pannello di anticorpi monoclonali. La differenza del corredo antigenico giustifica la protezione solo parziale e per tempi ridotti, indotta dalla vaccinazione effettuata con ceppi classici.
Un altro virus, denominato Rabbit Calicivirus (RCV), correlato a RHDV e inquadrabile come suo possibile progenitore, è stato isolato in conigli sani. RCV, responsabile di infezioni subcliniche, si discosta in modo significativo da RHDV in termini di patogenicità, titolo virale, tropismo tissutale, anche se la sequenza dell'unica proteina strutturale è assai simile a quella di RHDV (>90% di omologia). RCV moltiplica a livello enterico, causando un'infezione clinicamente inapparente ed evocando nei conigli una sieroconversione in grado di conferire resistenza alla malattia quando sono infettati con alte dosi di RHDV. Il rilievo di anticorpi con tecniche ELISA tradizionali (cELISA) nei soggetti all'ingrasso solitamente non vaccinati, unitamente alla determinazione delle sottoclassi di immunoglobuline permette una identificazione indiretta della presenza di virus apatogeni RCV e RCV-like. Indagini sieroepidemiologiche condotte in tempi e regioni differenti hanno dimostrato come oltre il 30% degli allevamenti industriali nel nostro Paese sia cronicamente infetto da RCV.
Inoltre, i dati sieroepidemiologici raccolti in diverse parti del mondo (Australia, Francia, Regno Unito) hanno permesso di ipotizzare prima e identificare poi altri virus apatogeni più o meno strettamente correlati a RHDV. In questi casi, stante la maggior differenza antigenica rispetto al virus patogeno classico, i titoli anticorpali in soggetti infetti possono essere rilevati utilizzando dei metodi ELISA ad elevata sensibilità, basati sull'utilizzo di antigeni parzialmente denaturati, e come tali in grado di riconoscere un'ampia varietà di epitopi virali. Infatti, in soggetti infetti da virus apatogeni come il RCV-A1 isolato in Australia, usando sistemi ELISA altamente specifici in grado di riconoscere anticorpi prodotti verso epitopi di superficie del solo RHDV, si ottengono risultati pressoché totalmente negativi. E ciò giustifica anche la scarsa o nulla cross-protezione verso infezioni da virus patogeni da essi indotta.

Specie sensibili
Il coniglio Europeo (*Oryctolagus cuniculus*) è la sola specie sensibile alla MEV/RHD causata da ceppi RHDV1 e nessun altro lagomorfo americano (*Romerolagus diazzi*, *Lepus californicus*, *Sylvilagus floridanus*) ed europeo (*Lepus europaeus*, *Lepus timidus*, *Lepus corsicanus*, *Lepus castroviejoi* e *Lepus granatensis*) si è dimostrato sperimentalmente recettivo. Di fatto, nei Paesi dove la malattia si è endemicizzata, il coniglio è presente anche allo stato selvatico, fatto che ne ha reso pressoché impossibile l'eradicazione. A questo assioma fa eccezione la dimostrata sensibilità della lepre sarda (*Lepus capensis* subs *mediterraneus*) al nuovo stipite virale RHDV2, che è in grado di causare in questa specie una malattia del tutto sovrapponibile alla RHD.

Nella lepre bruna (*Lepus europaeus*) è stata descritta all'inizio degli anni '80 in Nord-Europa, una malattia molto simile alla MEV/RHD, chiamata Sindrome della lepre bruna europea (EBHS, dall'inglese European Brown Hare Syndrome). Nonostante le numerose similitudini tra le due malattie, tra cui anche una stretta correlazione dei rispettivi agenti eziologici (71% identità nucleotidica, 78% identità e 87% similarità aminoacidica), si è visto non esistere cross-infezione tra le due specie ma anzi una stretta specie-specificità.

Proprietà e resistenza del virus

RHDV è molto stabile e persiste nell'ambiente: la sua infettività non viene ridotta al trattamento con etere o cloroformio e tripsina, alla esposizione a pH 3.0 o al riscaldamento a 50°C per 1 ora. Il virus sopravvive almeno 225 giorni in una sospensione d'organo conservata a 4°C, almeno 105 gg allo stato di essicazione su tessuto a temperatura ambiente e almeno 2gg a 60°C sia in sospensioni d'organo, sia allo stato di essicazione.

Il virus RHDV può sopravvivere nelle carcasse di coniglio "in campo" per almeno 3 mesi, mentre il virus esposto direttamente alle condizioni ambientali atmosferiche sopravvive per un periodo inferiore ad 1 mese. In un lavoro di campo sulla sopravvivenza di RHDV, il virus essiccato esposto direttamente alla luce solare su un striscia di cotone è risultato infettante in conigli sensibili per >10 gg ma <44 gg.

RHDV conserva la sua infettività alle basse temperature e rimane abbastanza stabile durante cicli di congelamento/scongelamento. RHDV viene inattivato dal trattamento con 1% idrossido di sodio e da altri agenti (es. candeggina) che determina una distruzione della componente proteica mediante innalzamento del pH >12. I trattamenti con formaldeide al 1.0–1.4% o beta-propiolactone al 0.2–0.5% a 4°C inattivano il virus ma non ne riducono l'immunogenicità e sono quindi indicate per la preparazione di vaccini spenti.

RHDV può essere inattivato dai raggi ultravioletti (UV) usando un "electronic UV crosslinker" con una dose UV di 168.48 W-s/cm2 e una intensità UV di 0.0078 W/cm2.

Epidemiologia

MEV/RHD è caratterizzata da elevati indici di morbilità (90-100%) e mortalità (40-90%). L'infezione si verifica tanto nei conigli domestici che selvatici di tutte le età, anche se la malattia causata da ceppi RHDV1 si osserva solo nei riproduttori e nei giovani di età superiore a 40-50 giorni. Le ragioni della resistenza dei giovani animali alla malattia non è chiara ed è probabilmente correlata alla patogenesi dell'infezione. Il nuovo ceppo RHDV2 è come detto in grado di ammalare anche soggetti di età inferiore ai 40gg, appena svezzati o ancora lattanti a partire dai 15-20gg di età. La morbilità paragonabile a quella della forma classica (90-100%) mentre la virulenza è inferiore rispetto a RHDV1/RHDV1a; la mortalità è sia più bassa (circa 20-30%) ancorché variabile con estremi da pochi punti percentuali fino al 60-70%.

MEV/RHD, indipendentemente dal ceppo causale (RHDV2 ha caratteristiche epidemiologiche sovrapponibili ai ceppi classici), si diffonde molto velocemente e l'infezione avviene per via nasale, congiuntivale o orale. La malattia si trasmette direttamente da animale infetto ad animale sano o indirettamente per contatto con carcasse infette o per ingestione di alimento o acqua contaminate con i secreti ed escreti di animali infetti. In virtù della sua elevata resistenza ambientale, deve essere inoltre considerata la possibilità di trasmissione mediante vettori passivi quali insetti, uccelli e roditori oppure tramite utensili e veicoli. Anche l'uomo può giocare un ruolo importante come vettore passivo del virus facilitando sia il passaggio dell'infezione da un allevamento all'altro per ciò che concerne i conigli domestici o disseminando il virus a distanza nel caso dei selvatici, soprattutto durante l'esercizio dell'attività venatoria. Non è inoltre esclusa la possibilità di disseminazione aerogena. E' stato dimostrato che il pelo di animali malati può veicolare il virus ed anche che i carnivori (cani e volpi) che si alimentano di carcasse di animali deceduti per MEV/RHD possono, pur non infettandosi, eliminare virus ancora infettante con le feci.

Sintomatologia

La malattia clinica di solito compare improvvisamente nell'ambito di un allevamento e può evolvere in forma iperacuta, acuta, subacuta o cronica. La MEV/RHD iperacuta di solito colpisce conigli suscettibili alla prima introduzione della malattia in un Paese indenne. La forma acuta è prevalente

nelle aree epidemiche mentre la forma subacuta/cronica si osserva di solito in un numero ridotto di animali che muoiono tardivamente od anche sopravvivono all'infezione.
I sintomi clinici sono osservabili soprattutto nel corso dell'evoluzione acuta della malattia, poiché la forma iperacuta è, come detto, priva di sintomatologia evidente e quella subacuta caratterizzata dagli stessi sintomi dell'acuta ma più sfumati. Il periodo d'incubazione varia da 1 a 3 giorni, la morte subentra dopo 12-36 ore dalla comparsa di febbre (>40°C). Durante questa fase si possono osservare diversi sintomi quali: anoressia, apatia, prostrazione, segni nervosi (convulsioni, atassia, paralisi, opistotono, pedalamento), urla e grida, segni respiratori (dispnea, scolo sanguinolento), cianosi delle membrane. Nel corso di un episodio clinico sostenuto da ceppi ad alta patogenicità un limitato numero di conigli (5-10%) può manifestare un andamento subacuto o cronico della malattia, caratterizzato da incubazione più lunga (fino a 6 gg) e decorso prolungato con comparsa di ittero grave e generalizzato, apprezzabile soprattutto a livello di mucose esplorabili e cute delle orecchie, perdita di peso e letargia. Tali animali di solito vengono a morte 1-2 settimane più tardi a causa dell'imponente disfunzione epatica. Tuttavia, in animali da carne le lesioni epatiche (degenerazione e necrosi) tipiche della malattia cronica, possono essere riscontrate al macello durante la visita post-mortem dopo regolare macellazione. Nei casi sostenuti da ceppo RHDV2, a parziale conferma dell'apparente minor patogenicità la malattia compare più tardivamente e il decorso è più protratto rispetto al ceppo classico: sintomi e mortalità si hanno 3-9 giorni post infezione e il decorso medio è di 5gg invece di rispettivamente 2-6gg e 3-4gg osservati per la malattia da RHDV classico.

Lesioni
Le lesioni macroscopiche sono specifiche e consistono essenzialmente in alterazioni circolatorie e degenerative. Esternamente si può osservare imbrattamento emorragico delle narici. Alla necroscopia le lesioni più imponenti sono a carico del fegato, trachea e polmoni. Il fegato appare di colore giallo-brunastro, con un disegno lobulare molto evidente, friabile, congesto e degenerato, spesso punteggiato di emorragie petecchiali. La mucosa tracheale è iperemica e contiene abbondante fluido schiumoso. I polmoni sono edematosi e congesti. La milza è aumentata di volume con margini arrotondati, soprattutto nei casi a evoluzione subacuta. Emorragie puntiformi e petecchiali sono evidenti nella maggior parte degli organi e sulle sierose. Tali lesioni sono di solito accompagnate da scarsa coagulazione del sangue. Lo stomaco, la vescica e la cistifellea sono generalmente pieni. Gastrite catarrale, enterite catarrale o emorragica, ipertrofia dei linfonodi meseraici e poplitei e reni pallidi sono reperti non costanti. Nei conigli con malattia cronicizzante si osserva una colorazione itterica, evidente a livello delle orecchie delle mucose, dell'intima delle arterie e del sottocute.
Le lesioni microscopiche del fegato sono di elevato significato diagnostico; si osserva epatite acuta con necrosi multifocale e i foci necrotici possono confluire per formare aree di maggiore estensione soprattutto in sede perilobulare (necrosi a ponte porto-portale). L'infiltrazione infiammatoria è scarsa e rappresentata soprattutto da linfociti negli spazi portali e da granulociti neutrofili nei sinusoidi e tra gli epatociti distrutti. Le lesioni tracheali e polmonari sono essenzialmente di tipo iperemico-edematoso, spesso associate a emorragie e microtrombi nei capillari alveolari. Le lesioni più importanti negli altri organi e tessuti sono rappresentate dalla carioressi dei tessuti linfoidi, che causa deplezione linfocitaria e linfopenia, dalla microtrombosi, molto frequente nei capillari glomerulari, e dall'iperplasia del tessuto ematopoietico del midollo osseo.

Patogenesi
Il meccanismo patogenetico della MEV/RHD non è stato del tutto chiarito. All'infezione per via orale, nasale o congiuntivale farebbe seguito una primaria localizzazione del virus a livello di cellule della mucosa oro-nasale e/o intestinale cui seguirebbe una prima viremia con successiva infezione delle cellule epatiche. Il fegato costituisce l'organo bersaglio, dove avviene la replicazione massiva del virus, che si osserva dapprima negli epatociti e quindi anche nelle cellule di Kupffer. In quest'organo il virus raggiunge le concentrazioni più elevate, mentre la presenza virale in altri organi e tessuti sono correlate all'imponente viremia che precede di alcune ore la morte. L'evento decisivo nello sviluppo di buona parte delle lesioni macroscopiche, evidenziabili in corso di MEV/RHD, è dovuto alla presenza di coagulazione intravasale disseminata (CID). Questa deriverebbe tanto da un danno vascolare virus-indotto, con attivazione del sistema intrinseco della coagulazione, quanto dal danno epatico, cui consegue la liberazione di tromboplastina tessutale e un'insufficiente clearance dei fattori

coagulanti, con attivazione del sistema estrinseco della coagulazione. La presenza di microtrombi nel sistema microvascolare, la riduzione del numero di piastrine e l'aumento dei tempi di trombina e protrombina, comporterebbero, in ultima analisi, un esaurimento dei fattori della coagulazione nel contesto di una coagulopatia da consumo, quindi di tipo primario, a sua volta causa della scarsa coagulazione del sangue che domina il quadro patologico. Una coagulopatia secondaria, che verrebbe ad aggravare il quadro di deficit emocoagulativo, deriverebbe dalla ridotta sintesi di fattori della coagulazione da parte degli epatociti danneggiati. E' stato altresì ipotizzato che la comparsa della CID sia da porre in relazione alla liberazione, da parte di tessuti linfoidi necrotizzati, di mediatori chimici, in particolare il TNF (*tumor necrosis factor*), causa del danno vasale, ed il CSF (*colony stimulating factor*) responsabile dell'iperplasia granulocitaria del midollo osseo. Tutto questo potrebbe anche in parte spiegare la refrattarietà alla malattia dei soggetti giovani, presupponendo un'immaturità del sistema immunitario che non consentirebbe l'instaurarsi della sequela di eventi patologici descritti. E' stata inoltre ipotizzata e in parte dimostrata una diversa suscettibilità individuale e, forse, anche legata ai diversi stipiti genetici, da porre in relazione alla espressione del complesso maggiore di istocompatibilità.

Diagnosi

Il fegato presenta i titoli virali più elevati (da 10^3 LD_{50} a $10^{6.5}$ LD_{50}) e pertanto rappresenta l'organo più adatto per l'identificazione virale. La quantità di virus riscontrabile negli altri tessuti e organi è direttamente proporzionale al loro grado di vascolarizzazione, per cui il siero (in fase acuta) e la milza (in fase subacuta/cronica) risultano sufficientemente ricchi in particelle virale da poter essere utilizzati quali materiali alternativi su cui eseguire l'indagine diagnostica.

Non sono state fino a oggi definite condizioni di crescita e substrati cellulari sensibili che consentano l'isolamento virale *in vitro*. Le sospensioni d'organo infette possono essere quindi esaminate direttamente con uno dei diversi metodi diagnostici sviluppati, tra i quali per la diagnosi di routine solitamente si usano:

- Sandwich Elisa test che utilizza anticorpi monoclonali (MAbs) RHDV-specifici
- Sandwich Elisa test che utilizza un pannello di anticorpi monoclonali (MAbs) RHDV-specifici. Questo test permette di distinguere il ceppo RHDV classico dalla variante RHDV e di identificazione nuovi stipiti RHDV correlati, compreso il ceppo RHDV2)
- Western Blot analysis che utilizza RHDV-MAbs che riconoscono epitopi interni e cross-reattivi anche con EBHS. Viene usato in quei casi che forniscono un esito dubbio all'esame ELISA e in quegli animali che vengono a morte dopo un decorso cronico della malattia, ovvero quando il virus si presenta in una forma "degradata" priva degli epitopi di superficie
- Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Questo è un test molto sensibile per la diagnosi di RHDV ed è circa 104 volte più sensibile dell'ELISA. Ciononostante la RT-PCR non è strettamente necessaria per la diagnosi di routine di RHDV, ma è molto più utile nell'esecuzione di indagini di epidemiologia molecolare, per studiare la patogenesi dell'infezione, per fare diagnosi in animali giovani, in ospiti non specifici, e vettori, per la diagnosi di infezioni da virus apatogeno e per la caratterizzazione (in associazione al sequenziamento genico) di nuovi ceppi. Esistono diversi protocolli applicabili per la diagnosi di MEV/RHD, alcuni in grado di identificare tutti i ceppi, altri che utilizzano primers specifici per i diversi ceppi virali, tra cui anche il nuovo RHDV2 (http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/695/DiagnosiRHDV_17ago2011.pdf).

Altri metodi diagnostici, molto utilizzati in passato e soprattutto agli esordi della malattia, sono oggi utilizzati solo in particolari situazioni. Tra questi vanno ricordati:

- Immunoelettronmiscroscopia (IEM) e Immunogold, usando un siero iperimmune di coniglio anti-RHDV o anticorpi monoclonali (MAbs) specifici;
- Test di emoagglutinazione (HA) con i globuli rossi umani tipo O.

A questi tests diagnostici si possono aggiungere altri metodi applicabili in situazioni particolari, tra cui l'immunoistochimica con MAbs RHDV specifici su tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina, l'immunofluorescenza su sezioni criostatiche e l'ibridazione in situ.

Il virus RHDV2 si dimostra HA positivo (globuli rossi umani tipo 0) e gli strumenti diagnostici utilizzati per la diagnosi di RHDV e RHDVa si dimostrano capaci di rilevare anche RHDV2, anche se con efficienza minore per le razioni sandwich ELISA. Pertanto sono stati sviluppati e sono oggi disponibili test specifici sia di PCR che immunoenzimatici (reazioni ELISAs con MAbs specifici).

Immunità e diagnosi sierologica

I conigli che sopravvivono alla malattia mostrano un'elevata siero conversione, facilmente rilevabile già a 4-6gg post infezione. Quindi, l'infezione da RHDV può essere diagnosticata anche mediante rilievo di anticorpi specifici. Poiché la risposta umorale riveste un'importanza decisiva nel proteggere gli animali dall'infezione, la verifica e la quantificazione della presenza di anticorpi specifici dopo vaccinazione o in animali convalescenti possono consentire di fornire una risposta definitiva sulla capacità degli animali di resistere all'infezione da RHDV. Tuttavia, questi non sono i soli casi in cui si può riscontare una risposta anticorpale specifica in quanto anche l'infezione con ceppi virali "apatogeni", antigenicamente correlati a RHDV, può indurre la comparsa dei cosiddetti anticorpi "naturali" in conigli provenienti da allevamenti con anamnesi negativa di malattia conclamata ed assenza di interventi vaccinali.

Tre tecniche basilari sono oggi utilizzate per la diagnosi sierologica di RHDV: Inibizione della Emoagglutinazione (HI), ELISA indiretta ed ELISA tipo competizione.

I test utilizzati per la diagnostica di routine comprendono:

- MAbs-ELISA tipo competizione (cELISA) che è considerato il test standard e di referenza per MEV/RHD. E' un test altamente specifico che misura soprattutto gli anticorpi diretti verso i determinanti antigenici esposti sulla superficie del virus, di fatto i più specifici e funzionalmente importanti;
- Sandwich ELISA sviluppate utilizzando MAbs anti-isotipo (isoELISAs o IgElisa) impiegate per testare i sieri per la presenza di anticorpi specifici anti-RHDV delle classi IgM, IgA e IgG. I titoli verso i singoli isotipi sono, infatti, di estremo valore ai fini della corretta interpretazione dei risultati sierologici e per riconoscere in modo esatto lo stato immunitario dei conigli (ad esempio per differenziare gli anticorpi di origine vaccinale da quelli di origine naturale o materna).

Altri metodi sierologici "addizionali" come l'ELISA indiretta (inELISA) e la "solid phase" ELISA (spELISA) possono essere usati in particolari indagini ed in articolare quando è richiesto il dosaggio anticorpale con un livello di sensibilità molto elevato, come può succedere se si ricercano anticorpi in specie non target o per identica anticorpi cross-reattivi indotti da virus correlati RHDV-like. Infine, è disponibile anche un test Sandwich ELISA per quantificare le IgM e IgG direttamente presenti nel fegato o nella milza; questo test è particolarmente utile nella diagnosi di forme croniche, quando l'identificazione virale può rivelarsi difficile.

E' stato dimostrato, anche sperimentalmente, che c'è una stretta correlazione tra i titoli in cELISA ed il grado di protezione dalla malattia ovvero conigli con titolo uguale o superiore a 1/10 risultano protetti se sottoposti a challenge con RHDV patogeno. Nei conigli convalescenti sopravvissuti alla malattia, si possono riscontrare titoli anche superiori a 1/20480, mentre nei vaccinati il titolo è solitamente nel range 1/40-1/640, in funzione anche del tempo intercorso dall'ultima vaccinazione. Nei conigli giovani, nati da madri sane, e svezzati all'età di 32-35gg gli anticorpi passivi di origine materna solitamente scompaiono entro i 30gg di età; viceversa durano più a lungo (fino a 50gg) nei soggetti nati da madri convalescenti e il loro titolo anticorpale è direttamente proporzionale a quello delle madri. Nei conigli svezzati di 35-45gg un basso livello anticorpale (1:80-1:320) può anche essere indotto da un'infezione attiva con ceppo patogeno, che, a questa età, raramente porta alla comparsa di quadri clinici conclamati. L'utilizzo dei metodi isoELISAs per la determinazione delle sottoclassi di immunoglobuline sono quindi fondamentali per una corretta interpretazione dei risultati. Infatti, in caso di anticorpi passivi di origine materna, troviamo solo IgG, in animali vaccinati non si ha produzione di IgA mentre nei conigli infettatisi di recente si osservano prima IgM poi IgA e IgG. Infine, l'insieme dei risultati sierologici nelle diverse categorie produttive (riproduttori, rimonta, ingrasso) unitamente alla identificazione virale da organi, può servire ad attribuire correttamente la risposta anticorpale ad una infezione con virus RHDV ad elevata patogenicità, rispetto ad un'infezione da virus RCV o RHDV apatogeno.

Sebbene i metodi sierologici sviluppati per RHDV1 siano in grado di riconoscere la componente anticorpale cross-reattiva da infezioni con RHDV2, le caratteristiche antigeniche differenziali di questo nuovo virus rendono possibile la differenziazione della risposta anticorpale indotta con test ELISA sierologici sviluppati ad hoc.

Controllo e Profilassi

Misure efficaci per il controllo del virus della malattia virale emorragica possono essere attuate unicamente nel coniglio allevato industrialmente e nei nuclei rurali, ma non nel coniglio selvatico. Considerando l'elevata virulenza e diffusibilità di RHDV la sola **profilassi diretta** risulta praticamente inefficace. Il controllo della malattia è quindi principalmente basato sulla attuazione di misure di **profilassi indiretta** mediante vaccinazione. Il vaccino classico, usato in tutti i paesi dove è comparsa la malattia è preparato usando una sospensione chiarificata di fegati di conigli infettati sperimentalmente, poi inattivata ed adiuvata. Recentemente sono stati sperimentati vaccini biotecnologici che sono attualmente in fase di registrazione. Negli allevamenti in cui vi è un'anamnesi recente negativa per MEV/RHD, è consigliabile vaccinare solo i riproduttori secondo il seguente schema: 1° vaccinazione a 50-60gg di età; 2° vaccinazione dopo 1 mese, rivaccinazione all'accoppiamento e poi richiami annuali. La vaccinazione degli animali all'ingrasso non è necessaria se la situazione dell'allevamento è normale, visto il breve ciclo di vita (circa 80gg) e considerando la loro resistenza naturale alla malattia fino a circa 35-40gg di età. Viceversa a seguito di un focolaio è fortemente consigliabile, anche laddove vengano attuate severe misure igienico sanitarie (pulizia e disinfezione delle strutture e degli ambienti, eliminazione controllata delle carcasse e adozione di periodi di vuoto sanitario), vaccinare anche gli animali all'ingrasso all'età di 40 giorni. Solo dopo un certo numero di cicli produttivi si può provare a interrompere la vaccinazione in un nucleo limitato di soggetti allo scopo di accertare l'eventuale persistenza del virus in allevamento. Gli animali vaccinati sviluppano in tempi brevi (4-7gg) una immunità protettiva verso RHDV. Di conseguenza la vaccinazione viene anche considerata un efficace trattamento post-esposizione ed è pertanto primariamente inclusa nelle strategie di emergenza applicate alla comparsa di MEV/RHD nelle conigliere.

Nonostante l'elevata efficacia della profilassi vaccinale, che ha permesso di ridurre quasi del tutto l'incidenza della MEV/RHD negli allevamenti intensivi, la probabilità di eradicare la malattia è molto bassa. La persistenza di MEV/RHD in forma endemica è assicurata dal frequente riscontro di casi di malattia, oltre che nei conigli selvatici, negli allevamenti rurali che, oltre ad un'estrema parcellizzazione sul territorio, presentano spesso scarse condizioni igieniche, una scarsa preparazione professionale dei proprietari, una facilità di contatto diretto o indiretto con sorgenti di virus quali animali a vita libera (uccelli, roditori etc,) o alimenti contaminati. Tutto ciò contribuisce a mantenere l'infezione endemica sul territorio e probabilmente riveste un importante e bidirezionale riflesso sulla presenza della malattia tra i conigli selvatici.

In Paesi dove RHDV è endemica può risultare utile l'applicazione delle seguenti norme: notifica dei focolai, soppressione e rimozione coatta degli animali infetti o sospetti di infezione, misure di igiene e disinfezione, macellazione o vaccinazione dei soggetti apparentemente sani, raccolta di informazioni o quarantena prima della introduzione di nuovi riproduttori, regole precise per fiere e mercati.

Norme e testi di riferimento

1. **D.P.R. 8.2.1954 n.320** "Regolamento di Polizia Veterinaria"
2. **Ordinanza Ministero della Sanità 01-12-1988** "Divieto d'importazione di conigli vivi e lepri ai fini della profilassi della malattia emorragica dei conigli" GU SG n. 300, 23-12-1988, p.20.
3. **Ordinanza Ministero della Sanità 08-09-1990** "Norme per la profilassi della malattia virale emorragica del coniglio" GU SG n. 217, 17-09-1990, p. 21.
4. **Lettera Ministero della Salute 03/03/2011 prot. 0004032-P** "Malattia Emorragica Virale del Coniglio (RHDV) – Segnalazione di nuova variante genetica ad inalterata alta patogenicità
5. **Lettera Ministero della Salute 06/08/2011 prot. 0014289-P** "Malattia Emorragica Virale del Coniglio (RHDV) – Conferma di nuova variante patogena"
6. **OIE's Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals** (2008) "Rabbit Haemorrhagic Disease" (chapter 2.6.2) Version adopted in May 2010.
7. **OIE's Terrestrial Animal Health Code** (2011) Rabbit Haemorrhagic Disease (Chapter 13.2).

Siti web di riferimento

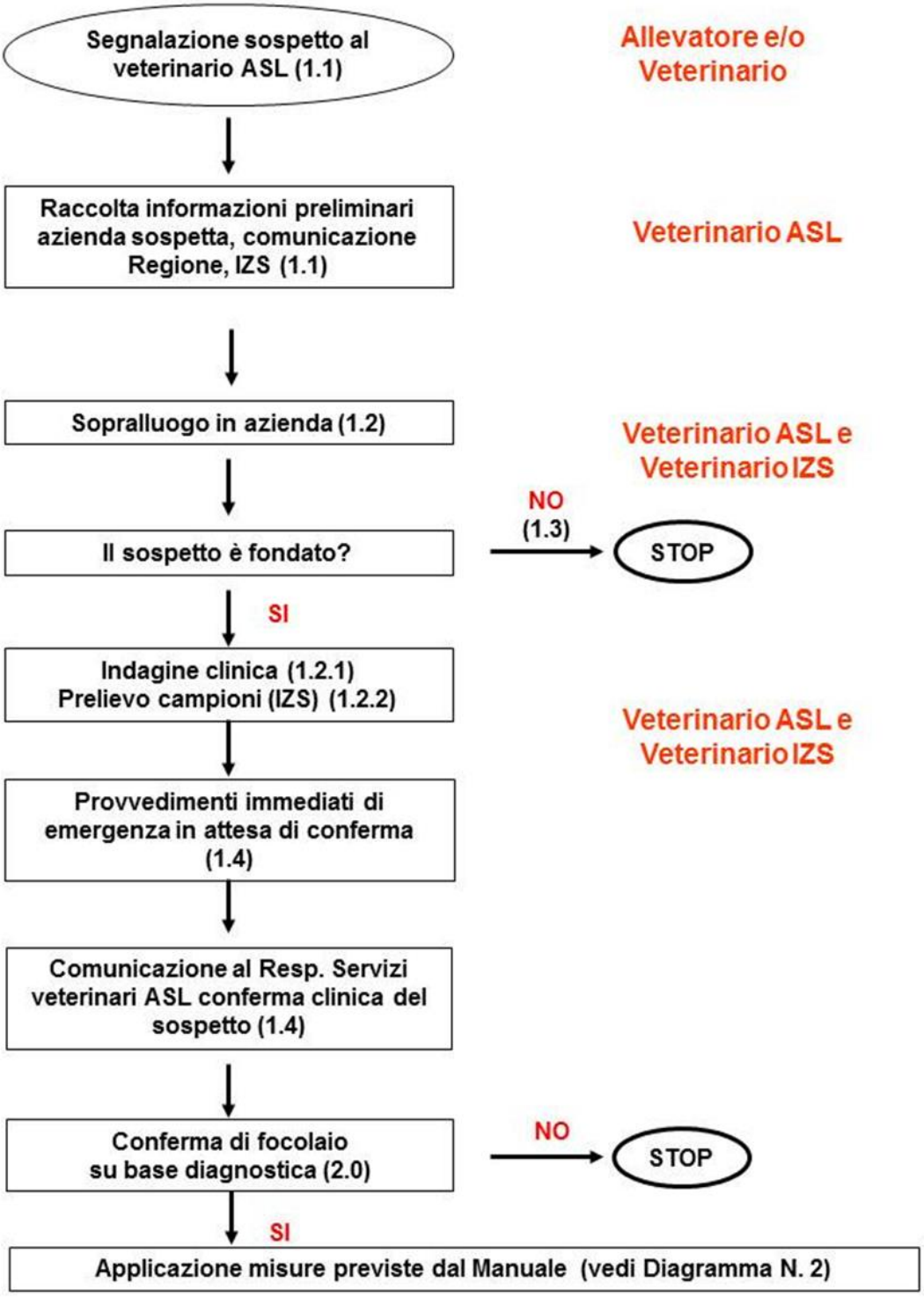
- Centro di Referenza Nazionale Malattie Virali dei Lagomorfi - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
  http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=377
- Sorveglianza Epidemiologica Lombardia (SEL) - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
  http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=236
- OIE web site
  http://www.oie.int
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals
  http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/
- OIE Terrestrial Animal Health Code
  http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/

a. divieto di movimentazione degli animali in entrata ed uscita ed eventuale movimentazione in uscita dei conigli a fine ingrasso unicamente con invio "in vincolo" al macello, con preavviso al Veterinario ufficiale competente per l'impianto di macellazione e con trasporto esclusivo del gruppo su automezzi lavati e disinfettati prima del carico. La macellazione dei gruppi "in vincolo" dovrà essere effettuata a "fine ciclo di macellazione".
b. divieto per il personale aziendale di avere contatto con animali sensibili di altri allevamenti;
c. divieto d'uscita di mangimi, utensili, oggetti od altri materiali sospetti di contaminazione;
d. permesso di entrata e uscita dall'azienda di automezzi solo previa disinfezione delle ruote e della parte sottostante il veicolo e registrazione in apposito registro dell'entrata e uscita dall'azienda di automezzi e di persone;
e. registrazione dei dati della mortalità, per ciascuna categoria produttiva, al fine di rendere tracciabile l'evoluzione dello stato sanitario.

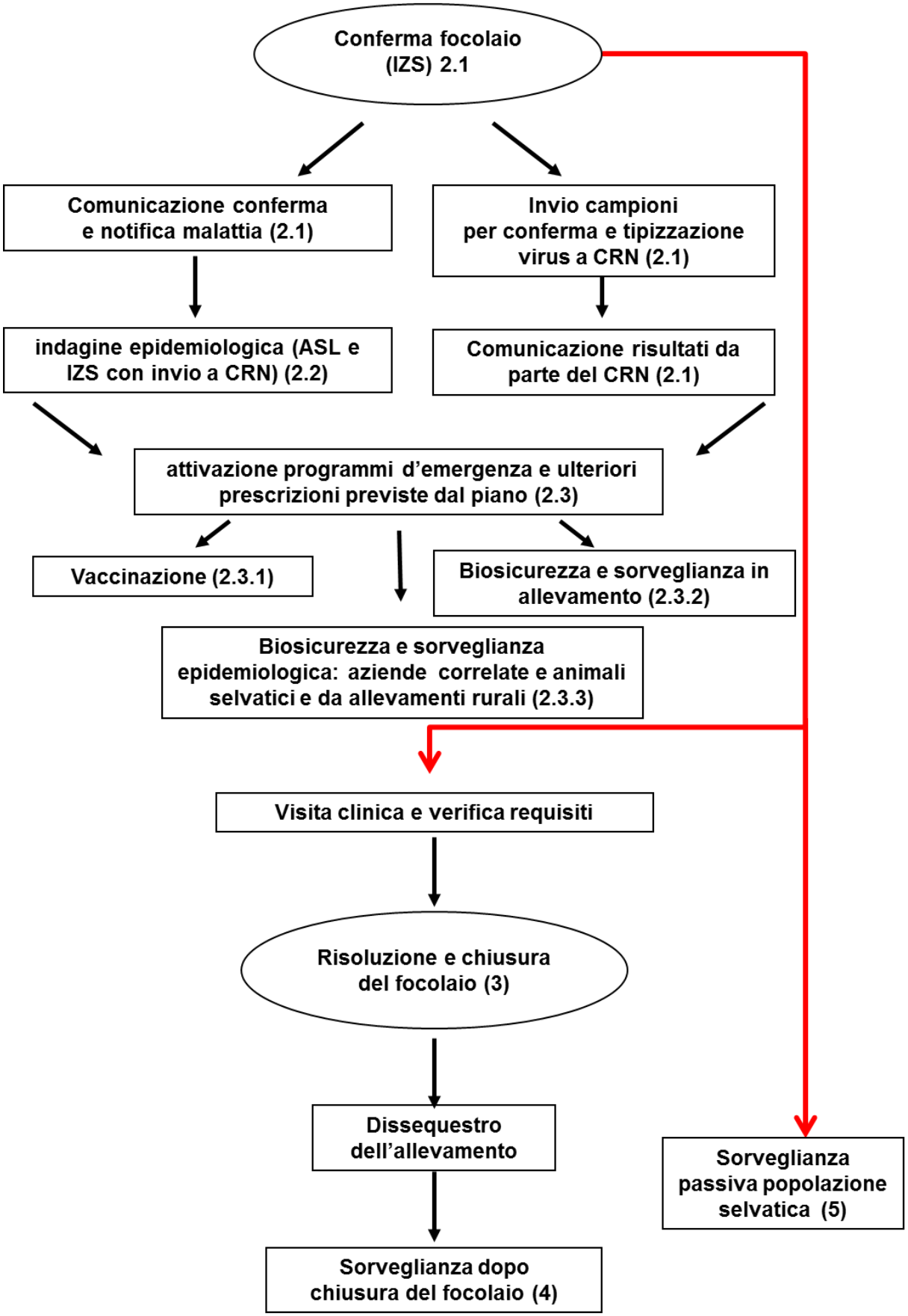
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/RHD_FINAL.pdf

B. DIAGRAMMI DI FLUSSO

1. Attività da svolgere in caso di sospetto



2. Attività da svolgere dopo la conferma



C. PROCEDURE OPERATIVE

1. Sospetto focolaio

1.1 Segnalazione

Il sospetto di presenza di Malattia Emorragica Virale (MEV/RHD) si pone quando si osserva una o più delle seguenti situazioni:

a) riscontro di tassi di mortalità superiori alla norma, non chiaramente riferibili a patologie note;
b) presenza di sintomatologia e quadro clinico tipici e/o lesioni e reperti necroscopici riferibili di MEV/RHD;
c) positività sierologica riferibile a infezione (presenza di IgA e/o IgM) in soggetti adulti non vaccinati.

Il detentore a qualunque titolo degli animali, il veterinario e tutti i professionisti che a vario titolo frequentano l'allevamento o comunque operano nell'azienda (es. veterinario/tecnico del mangimificio) sono obbligati a comunicare tempestivamente il sospetto di MEV/RHD alle autorità competenti.

Nel caso in cui si sospetti la presenza di Malattia Emorragica Virale (MEV/RHD), il Veterinario ufficiale avvia immediatamente un'indagine volta a confermare o escludere la presenza della malattia e sottopone l'azienda a sorveglianza ufficiale.

Il Veterinario ufficiale immediatamente dopo la segnalazione:

- impartisce istruzioni atte a controllare la movimentazione di persone, animali e cose nell'allevamento sospetto;
- avvisa il responsabile del Servizio Veterinario e Servizi Veterinari della Regione di appartenenza;
- effettua un'indagine epidemiologica preliminare circa
  i. ubicazione, tipologia e consistenza dell'allevamento,
  ii. sintomi rilevati ed eventuali perdite (mortalità),
  iii. entrate e uscite di animali nei 30 giorni precedenti.
- provvede, inoltre, con il supporto del Veterinario IZS, a:
  i. eseguire la visita clinica;
  ii. prelevare i campioni per le analisi di conferma di laboratorio.

1.2. Accesso, visita ed indagine in azienda

Qualora non si trovasse già nell'allevamento, il Veterinario ufficiale vi si reca avendo l'accortezza di parcheggiare la propria vettura all'esterno dell'azienda o comunque a debita distanza.
L'accesso in azienda deve avvenire dopo aver indossato idonei indumenti monouso in equipaggiamento. Nella zona dove avviene il cambio dei vestiti, è necessario vi siano dei sacchi di plastica capienti e del disinfettante.

1.2.1 Indagine clinica

Scopo dell'indagine clinica è quello di definire la situazione sanitaria di tutto l'allevamento, di individuare sia i casi di malattia sia quelli sospetti, onde acquisire informazioni complete e dettagliate (es. conigli presenti in azienda e storia clinica). Nel corso della visita clinica si dovranno censire i conigli per categoria e per ognuna di queste dovrà essere indicato il numero dei morti.

1.2.2 Modalità di prelievo e di trasporto dei campioni

Nel corso della visita clinica si dovranno prelevare i campioni per confermare o escludere con indagini di laboratorio la presenza dell'infezione. Il prelievo potrà essere costituito da una o entrambe le tipologie di campionamento seguenti:

- carcasse o porzioni di organi (fegato e milza) di animali che manifestano i sintomi/segni/lesioni della malattia per la diagnosi virologica;
- campioni di sangue ai fini della diagnosi sierologica. In questo caso si campionerà un numero di animali determinato sulla base del numero di conigli presenti in azienda per ciascuna categoria produttiva (riproduttori, rimonte, ingrasso, maschi) come riportato in tabella 1, per consentire l'individuazione della malattia con una prevalenza attesa del 20% ed un livello di confidenza pari al 95%.

Tabella 1: Numero di animali da sottoporre a prelievo di sangue in relazione al numero di animali, per ciascuna categoria, presenti in azienda (P ≥ 20%; IC 95%)

N° animali presenti	N° animali da campionare
≤100	**12**
100< x ≤2000	**13**
>2000	**14**

I campioni di sangue vanno raccolti in provette di materiali che garantiscano la produzione di una buona quantità di siero, come il polipropilene. Vanno lasciati sierare a T° ambiente per circa un'ora e poi conservati a temperatura di frigo.

Tutti i campioni prelevati dai focolai devono essere riposti in barattoli a chiusura ermetica avendo cura di identificarli chiaramente. I campioni vanno quindi racchiusi in sacchetti di plastica per alimenti. Le carcasse degli animali morti possono essere inserite in sacchi di plastica (tipo rifiuti solidi urbani o autoclavabili). Per il trasporto al laboratorio, i campioni vanno posti in contenitori isotermici in modo da evitare un surriscaldamento soprattutto durante la stagione estiva e inviati quanto prima alla Sezione dell'IZS competente per territorio, mantenendo la T°C di refrigerazione (4°C).

L'invio al laboratorio deve essere accompagnato da una scheda riportante l'elenco dei campioni, utilizzando la scheda allegata (***Allegato 1 – sezione a***).

1.3 Infondatezza del sospetto

Nel caso in cui, con la visita clinica si possa escludere con certezza la presenza di MEV/RHD e si possa effettuare la diagnosi di altra patologia, si lascerà l'allevamento senza effettuare il prelievo dei campioni. Infatti, partendo dal fatto che il sospetto può essere emesso in caso di uno scostamento dei livelli di mortalità, se alla visita emerge che il quadro clinico è chiaramente riferibile ad altra patologia (es. enterite in classi di età definite, problematiche respiratorie e/o riproduttive), si può ragionevolmente pensare che non ci sia un sospetto di MEV/RHD.

In tutti gli altri casi, anche quando la mortalità è subdola o assente (es. in allevamento epidemiologicamente correlato), non sussistono le condizioni per escludere clinicamente la MEV/RHD e quindi si effettuerà il prelievo di campioni per analisi virologiche e/o sierologiche.

1.4 Uscita dall'azienda sospetta infetta; provvedimenti in attesa di conferma

Finita la visita dell'allevamento, i sanitari provvedono a raccogliere e riporre le tute e qualsiasi altro materiale utilizzato (calzari guanti, mascherina, sacchetti, etc.), nell'apposito

sacco di plastica che, al momento, rimane nell'allevamento per essere in seguito distrutto; dopodiché si lavano e si disinfettano accuratamente le mani.

Il Veterinario ufficiale provvede inoltre a impartire disposizioni scritte atte ad impedire la diffusione della sospetta infezione con particolare riferimento alla movimentazione di animali, utensili, attrezzature oggetti od altri materiali e all'ingresso e uscita di automezzi e persone. Inoltre, individua i punti di accesso in allevamento per potere organizzare il lavaggio e la disinfezione dei mezzi in uscita.

Le persone presenti in azienda non dovrebbero visitare altri allevamenti cunicoli fino alla caduta del sospetto o in caso di conferma, dopo l'ultimo contatto con l'allevamento infetto. Nel caso risultasse indispensabile ai veterinari accedere ad altri allevamenti, essi devono adottare tutte le misure preventive atte a evitare l'ulteriore diffusione della malattia (docce, cambio di indumenti, disinfezione di automezzi, attrezzature, uso di strumenti monouso, etc. etc.).

In attesa degli esiti delle analisi di laboratorio, il Veterinario ufficiale pone sotto sequestro cautelativo l'allevamento e dispone l'attivazione immediata delle seguenti procedure di emergenza:

a. divieto di movimentazione degli animali in entrata ed uscita. E' permessa la movimentazione in uscita dei conigli a fine ingrasso unicamente con invio "in vincolo" al macello, con preavviso al Veterinario ufficiale competente per l'impianto di macellazione e con trasporto esclusivo del gruppo su automezzi lavati e disinfettati prima del carico. La macellazione dei gruppi "in vincolo" dovrà essere effettuata a "fine ciclo di macellazione".
b. divieto per il personale aziendale di avere contatto con animali sensibili di altri allevamenti;
c. divieto d'uscita di mangimi, utensili, oggetti od altri materiali sospetti di contaminazione;
d. permesso di entrata e uscita dall'azienda di automezzi solo previa disinfezione delle ruote e della parte sottostante il veicolo e registrazione in apposito registro dell'entrata e uscita dall'azienda di automezzi e di persone;
e. registrazione dei dati della mortalità, per ciascuna categoria produttiva, al fine di rendere tracciabile l'evoluzione dello stato sanitario.

E' consigliabile, in attesa degli esiti di laboratorio, procedere alla vaccinazione immediata dei riproduttori e delle rimonte.

Queste misure devono essere mantenute fino a quando il sospetto non viene definitivamente escluso o, nel caso di conferma, fino alla chiusura del focolaio (vedi oltre).

Le stesse misure possono essere estese ad altre aziende, qualora sia presente un contatto epidemiologico rilevante.

2. Conferma di focolaio

2.1 Definizione di positività

Un focolaio s'intende confermato quando le analisi virologiche per MEV/RHD eseguite presso il Laboratorio dell'IZS competente per territorio, risultano positive.
Il Veterinario ufficiale attua quanto previsto dal RPV e notifica la malattia al Servizio Veterinario Regionale e al Ministero della Salute, secondo le procedure previste da ciascun Servizio Veterinario Regionale.

Il laboratorio che ha effettuato la diagnosi confermativa di prima istanza, oltre ad avvisare il Veterinario dell'ASL competente per territorio per gli adempimenti previsti (vedi sopra), invia i campioni risultati positivi al Centro di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi presso l'IZSLER per la caratterizzazione e tipizzazione del ceppo virale. Il Centro di referenza esegue la diagnosi di caratterizzazione e tipizzazione del ceppo virale e provvede a darne comunicazione all'IZS competente per territorio (Direzione sanitaria e Responsabile di sezione che ha effettuato la diagnosi di prima istanza e trasmesso i campioni).

2.2 Indagine epidemiologica

Una volta confermato il focolaio il veterinario ufficiale e il veterinario IZS (eventualmente coadiuvati nella raccolta dei dati e informazioni dal veterinario di allevamento) devono recarsi in allevamento per eseguire un'indagine epidemiologica esaustiva utilizzando la scheda di cui all'***Allegato 2***. I risultati dell'indagine epidemiologica sono registrati a cura del Servizio veterinario dell'ASL competente per territorio nel Sistema informativo nazionale malattie animali (SIMAN) e la stessa scheda è resa disponibile in formato pdf in detto sistema al fine di metterla integralmente a disposizione del Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi.
Le informazioni ottenute dall'indagine epidemiologica, con particolare riferimento alle movimentazioni di animali, prodotti, personale da e per l'azienda e ai contatti diretti/indiretti dell'azienda infetta con altre aziende nel periodo a rischio (*tracing*), sono mirate all'individuazione della fonte d'infezione, degli allevamenti a rischio ed degli eventuali focolai secondari.
In particolare:

- va tenuto conto del momento in cui il virus può essere entrato in azienda, che è più probabilmente ricompreso nel periodo massimo di incubazione della malattia (che varia a seconda del tipo di ceppo causale, più lunga nel caso di RHDV2, più breve nel caso di RHDV classico e RHDVa) ed è pari a max 7-10gg. Per individuare la possibile origine dell'infezione, bisogna tuttavia tenere conto della circolazione in azienda degli animali, in funzione della ciclizzazione attuata, e diventa quindi utile rintracciare movimenti in ingresso dell'azienda avvenuti nei 30 giorni precedenti l'inizio dei sintomi;
- per individuare la possibile diffusione dell'infezione verso altre aziende, devono essere rintracciati i movimenti in uscita avvenuti dai 30 giorni precedenti l'inizio dei sintomi in azienda al momento del sequestro dell'azienda. E' pertanto necessario definire con la maggior precisione possibile, il momento d'inizio dei sintomi riferibili a MEV/RHD o di aumento anomalo della mortalità;
- il rintraccio dei movimenti per stabilire origine dell'infezione e diffusione verso altre aziende va eseguito dando priorità alle movimentazioni di conigli vivi, ma a seguire, di personale, mangimi, rifiuti, automezzi vari, attrezzature e altri materiali;
- il personale coinvolto nelle operazioni di trasporto del mangime nell'allevamento, nel carico degli animali per il macello, il personale operante in azienda, i veterinari, i commercianti ed eventuali altri visitatori ecc. devono essere identificati e devono essere acquisite informazioni relative ai loro possibili contatti avvenuti nei 3 giorni successivi alla visita in azienda.

2.3 Ulteriori procedure da attuare a seguito di conferma di focolaio

La conferma di focolaio, oltre a prevedere l'applicazione in continuo delle procedure di emergenza previste in caso di sospetto (con la sola esclusione del divieto di introduzione di animali da rimonta per cui valgono le indicazioni di cui al punto 2.3.2.a) implica anche

l'adozione delle misure e comportamenti di seguito elencati:

a. vaccinazione di emergenza dei riproduttori e delle rimonte e degli animali all'ingrasso secondo le modalità sotto riportate (vedi 2.3.1);
b. rimozione controllata delle carcasse con stoccaggio in celle frigorifere ed eventuale smaltimento con automezzi autorizzati a tenuta ai sensi della normativa vigente. Se l'automezzo non è dedicato il carico deve essere effettuato come ultimo viaggio;
c. pulizia e disinfezione degli ambienti, delle strutture delle attrezzature (vedi *Allegato 5*);
d. ingresso e uscita di persone dall'allevamento alle condizioni poste dall'autorità sanitaria

2.3.1 Vaccinazione

La vaccinazione deve essere eseguita su tutto l'effettivo (riproduttori + ingrasso) con le seguenti modalità:

- Riproduttori: la vaccinazione dovrebbe essere ripetuta di regola non oltre 4 mesi dal primo intervento e in seguito circa ogni 4-6 mesi; tale programma è tuttavia modulabile e va calibrato in funzione del tipo di vaccino utilizzato (eterologo vs omologo) e della situazione sanitaria osservata.
- Conigli "allo svezzamento": sono vaccinati i gruppi allo svezzamento (30-35gg) ed è necessario mantenere un gruppo di animali sentinella non vaccinati in ciascuna partita di svezzati (il numero viene stabilito in base ai criteri della tabella 1). Infatti, l'eventuale circolazione del virus patogeno può essere svelata attraverso l'esecuzione di test sierologici sul siero prelevato dai soggetti sentinella, che non devono ovviamente presentare anticorpi specifici da infezione.
- Conigli all'ingrasso di maggiore età: la vaccinazione degli altri gruppi all'ingrasso può non essere eseguita, in funzione del tempo occorrente prima di avviarli al macello. La scelta circa la vaccinazione è quindi a discrezione dell'allevatore.
- Nel corso del focolaio e dopo la sua estinzione è consigliabile vaccinare almeno 3 cicli di ingrasso allo svezzamento, sempre mantenendo un gruppo sentinella non vaccinato da sottoporre a monitoraggio sierologico.
- Si raccomanda, al fine di garantire la miglior protezione anticorpale e evitare nel contempo la selezione di ceppi virali a maggior virulenza, l'utilizzo di vaccini omologhi rispetto al ceppo virale causale (RHDV1 o RHDV2) eventualmente ricorrendo, laddove non vi fossero prodotti registrati disponibili, alla preparazione ed utilizzo di vaccini stabulogeni.

2.3.2 Biosicurezza e sorveglianza in allevamento

a. L'introduzione in allevamento degli animali ai fini di rimonta può avvenire esclusivamente a condizione che essi siano certificati aver ricevuto almeno due vaccinazioni. Il Veterinario ufficiale, oltre a controllare la certificazione di scorta agli animali può a campione disporre l'esecuzione di esami sierologici per verificare lo stato di protezione degli animali o per escludere la presenza di anticorpi indotti da infezione con virus di campo (dosaggio di IgA e IgM);
b. I soggetti deceduti (soprattutto riproduttori) con lesioni sospette o comunque non chiaramente riferibili a patologie note devono essere sottoposti a campione ad accertamenti virologici per MEV/RHD, fino alla chiusura del focolaio. L'invio al laboratorio dei campioni deve essere accompagnato dalla scheda allegata riportante l'elenco dei campioni (Allegato 1a).
c. Le deiezioni devono essere stoccate per un tempo di almeno 45 gg prima di essere utilizzate per la concimazione. In alternativa possono essere immediatamente smaltite attraverso ditte specializzate e trasportate in condizioni di sicurezza, con destinazione anche bioenergetica;

d. In sede di macellazione, l'utilizzo delle pelli di conigli, appartenenti a partite inviate in vincolo al macello o comunque per partite di animali provenienti da zone sottoposte a provvedimenti sanitari, è consentito nel caso in cui esse vengano sottoposte, secondo quanto previsto dal OIE Terrestrial Animal Health Code, a trattamento di essicazione (o congelamento) per almeno un mese e inattivazione con trattamenti spray di formalina al 3% o mediante fumigazione eseguita entro i 7gg prima della spedizione. Si raccomanda, inoltre, che lo stoccaggio e il trasporto delle pelli avvengano in condizioni e modalità controllate. Per la commercializzazione delle pelli si suggerisce di utilizzare i modelli di cui all'Allegato 3 (Attestazione sanitaria integrativa per l'esportazione extra-comunitaria) che scorterà gli animali dall'allevamento al macello e all'Allegato 4 (Certificato per prodotti non commestibili di origine animali destinati all'esportazione).

2.3.3. Biosicurezza e sorveglianza epidemiologica

Nelle aziende epidemiologicamente correlate ad allevamenti sede di focolaio, qualora la correlazione sia di tipo funzionale (filiera organizzata) o geografico/territoriale, in particolare quando l'allevamento sede di focolaio insiste in aree a elevata densità di allevamenti, opportunamente e preventivamente identificate da ciascuna Regione, e in quelle rintracciate a seguito di evidenza di spostamento di animali, persone, mangimi, automezzi, attrezzature e altri materiali si attuano le seguenti misure:

a. rafforzamento di tutte le misure di biosicurezza e delle normali prassi di igiene e disinfezioni già in atto;
b. registrazione quotidiana della mortalità per ciascuna categoria produttiva, al fine di rendere tracciabile l'evoluzione dello stato sanitario;
c. accertamenti virologici per MEV/RHD su soggetti deceduti (soprattutto riproduttori) con lesioni sospette o comunque non chiaramente riferibili a patologie note;
d. applicazione dello stesso protocollo vaccinale del parco riproduttori e delle rimonte previsto per gli allevamenti sede di focolaio;
e. creazione di gruppi di animali "sentinella" non vaccinati nell'eventualità che si opti per la vaccinazione anche degli animali all'ingrasso, per verificare, attraverso l'analisi sierologica, la presenza di specifici anticorpi e l'eventuale circolazione virale;
f. introduzione in allevamento degli animali ai fini di rimonta con una delle seguenti caratteristiche:
   - animali lattanti di età inferiore a 7gg da avviare alla rimonta/riproduzione
   - animali di qualsiasi età esclusivamente a condizione che abbiano ricevuto due vaccinazioni

Queste misure dovrebbero di norma venir applicate fino alla risoluzione e chiusura dei focolai notificati negli allevamenti da cui origina la correlazione epidemiologica.

In tutti i casi di focolaio di MEV/RHD confermato, è opportuno che il veterinario ufficiale dell'ASL competente per territorio, anche con il supporto della locale sezione IZS, verifichi:

- la presenza di segnalazioni di mortalità in allevamenti a carattere rurale/familiare e in animali da compagnia
- la comparsa di eventuali mortalità di lagomorfi selvatici, favorendo il conferimento di carcasse per analisi diagnostiche all'IZS utilizzando la scheda di accompagnamento specifica (***Allegato 1- sezione b***).

3. Chiusura del focolaio

Un focolaio di MEV/RHD può considerarsi estinto e quindi essere chiuso nel momento in cui si verificano tutte le seguenti condizioni:

a. assenza di quadro clinico, mortalità e lesioni anatomo-patologiche riferibili a MEV/RHD;
b. assenza di esiti virologici positivi per ceppo RHDV patogeno su organi di animali deceduti naturalmente (vedi punto 2.3);
c. risultati favorevoli degli esami sierologici ed in particolare:
   - esito negativo degli esami sierologici su animali sentinella non vaccinati esaminati;
   - assenza di IgA e IgM (indice di infezione) in un gruppo campione di animali vaccinati esaminati

Tali condizioni si devono tutte concretizzare e pertanto non è definibile a priori un riferimento temporale di durata del sequestro. Verranno eseguite più visite, almeno con cadenza mensile, fino a che si verifica la sussistenza delle condizioni elencate. Durante tali visite il Veterinario Ufficiale, supportato da IZS e CNR, potrà disporre il prelievo di campioni (carcasse e/o sieri) per l'accertamento dello stato sanitario.

4. Sorveglianza dopo la chiusura del focolaio

Nelle aziende cunicole intensive, già sede di focolaio, si applicano in maniera rigorosa le misure di biosicurezza e le buone pratiche di allevamento di cui all'allegato A della Circolare ed inoltre:

a) vaccinazione del parco riproduttori e delle rimonte: vaccinazione dei riproduttori ogni 4-6 mesi in funzione del tipo di vaccino utilizzato (eterologo vs omologo) e della situazione sanitaria osservata;
b) nell'eventualità che si opti, anche dopo l'estinzione del focolaio, di reiterare la vaccinazione per un numero variabile di cicli anche degli animali all'ingrasso è buona norma mantenere un gruppo sentinella non vaccinato per verificare, attraverso l'analisi sierologica, la presenza di specifici anticorpi e l'eventuale circolazione virale;
c) accertamenti virologici per MEV/RHD, a campione, su soggetti deceduti (soprattutto riproduttori), con lesioni sospette o comunque non chiaramente riferibili a patologie note, nei tre mesi successivi alla chiusura del focolaio;
d) analisi sierologica su non meno di 30 capi all'ingrasso non vaccinati o sentinelle di 55-60gg di età e controllo virologico (da fegato, milza e intestino) di 5 animali in caso di riscontro di positività sierologica, da eseguirsi dopo tre e non oltre sei mesi dalla chiusura del focolaio.

Nelle aziende epidemiologicamente correlate ad allevamenti sede di focolaio, qualora la correlazione sia di tipo funzionale (filiera organizzata) o geografico/territoriale, in particolare quando l'allevamento sede di focolaio insiste in aree ad alta densità di allevamenti, opportunamente e preventivamente identificate da ciascuna Regione, e in quelle rintracciate a seguito di evidenza di spostamento di animali, persone, mangimi, automezzi, attrezzature e altri materiali si applicano tutte le medesime misure di biosicurezza, buone pratiche di allevamento, vaccinazione e controlli diagnostici in allevamento di cui sopra, con esclusione di quanto previsto al punto d).

5. Sorveglianza passiva popolazione selvatica

La possibile diffusione della malattia in animali selvatici impone un rafforzamento della sorveglianza passiva sul territorio. A tal fine i gestori della fauna selvatica e di interesse venatorio devono rivolgere particolare attenzione a segnalare eventuali episodi di mortalità in lagomorfi selvatici, favorendone il recupero ed il conferimento ai servizi veterinari e agli IIZZSS localmente competenti, per l'esame delle carcasse e la determinazione delle cause di morte. Per ciascun soggetto conferito sono riportati nell'apposita scheda di conferimento (***Allegato 1- sezione b***) i dati relativi a sesso, età, data del prelievo, comune e località di ritrovamento, organi conferiti.

ALLEGATO 1

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA

Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi

Sorveglianza Epidemiologica della Lombardia

MALATTIA EMORRAGICA VIRALE (MEV/RHD)

SCHEDA DI ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI

All'IZS di……..

A) Conigli allevati

Data prelievo ___/___/___

Prelievo effettuato da:_____ **in qualità di:** _____

Servizio Veterinario dell'ASL di: _____**Prov.** ___ **Regione**_____

Recapito telefonico _____ **Fax**_____ **@mail:** _____

DATI ANAGRAFICI ALLEVAMENTO

Proprietario/ragione sociale _____

Codice aziendale (da riportare obbligatoriamente) I__I I__I I__I / I__I I__I / I__I I__I I__I

Comune _____**Via/Loc.** _____**Prov.**_____

Tip. allevamento: ❑ industriale ❑ rurale ❑ stabulario ❑ altro _____

CAUSALE PRELIEVO

❑ **Sospetto di focolaio** data sospetto _____

❑ **Focolaio confermato** data conferma _____

❑ **Correlazione epidemiologica con un focolaio** → Denom. e cod. azienda a cui è correlato

_____

❑ **Allevamento ubicato in zona restrizione** → Denom. e cod. azienda del focolaio

_____

MONITORAGGI

❑ **Monitoraggio di animali NON VACCINATI** (ingrasso in allevamenti VACCINATI in zona di restrizione)

❑ **Monitoraggio di animali sentinella, in allevamenti VACCINATI**

❑ **Monitoraggio di animali VACCINATI** (Tipo Vaccino:_____)

❑ **Monitoraggio nuovi riproduttori VACCINATI introdotti in azienda**

❑ **Altro** _____

IDENTIFICAZIONE CAMPIONI

(A) Carcassa **(B)** Fegato **(C)** Milza **(D)** Polmone **(E)** Sangue **(F)** Feci **(S)** Sangue
(Altro) Altro (specificare)
(1) Femmine in produzione **(2)** Rimonta non in produzione **(3)** Maschi **(4)** Ingrasso **(5)** Lattanti

Tipo materiale prelevato (A/B/C/D/E/F/S/Altro)	Categoria (1/2/3/4/5)	N° Campioni	Vaccinati	Sintomi e lesioni
			❑ no ❑ si	❑ no ❑ si
			❑ no ❑ si	❑ no ❑ si
			❑ no ❑ si	❑ no ❑ si
			❑ no ❑ si	❑ no ❑ si
			❑ no ❑ si	❑ no ❑ si

NOTE:

_____

_____

Timbro e Firma del Veterinario

B) Conigli selvatici

Data prelievo ___/___/___
Prelievo effettuato da:_____ in qualità di: _____
Servizio Veterinario dell'ASL di: _____Prov. ___ Regione_____
Recapito telefonico _____Fax_____@mail: _____

☐ **Carcassa**
☐ **Visceri (fegato milza polmone altro …….**
☐ **Sangue**

SESSO: M ☐ F ☐ ETA': ADULTO ☐ GIOVANE ☐

IL CAPO E' STATO:
☐ **RINVENUTO MORTO** ☐ **ABBATTUTO** ☐ **CATTURATO**

Nel comune di _____ Località_____

Provincia _____, in:

☐ **zona libera all'attività venatoria**
☐ **zona di ripopolamento e cattura nome.....**
☐ **zona di rifugio (zona rossa) nome.....**
☐ **altro..... Dell'atc/ca.....**

NOTE:
_____
_____
_____
_____

Timbro e Firma del Veterinario

ALLEGATO 2

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA

Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi

Sorveglianza Epidemiologica della Lombardia

MALATTIA EMORRAGICA VIRALE (MEV/RHD)

SCHEDA DI INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Data …./…./…….

VETERINARIO CHE HA ESEGUITO L'INDAGINE: …….

TELEFONO ……/…….

Motivo dell'effettuazione dell'indagine:
POSITIVITA' VIROLOGICA ☐
CORRELAZIONE EPIDEMIOLOGICA ☐
Codice azienda cui è correlato _____

1. ANAGRAFE DELL'AZIENDA

CODICE AZIENDALE: ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

DENOMINAZIONE DELL'AZIENDA:
……

PROPRIETARIO: ……..

DETENTORE (se diverso dal proprietario): ……

INDIRIZZO DELL'AZIENDA: ……..

COMUNE: ……PROVINCIA: ……..

LOCALIZZAZIONE GEOGRAFICA DEL FOCOLAIO (formato UTM WGS84):

Longitudine _____° _____' _____»

Latitudine _____° _____' _____»

ASL: ……DISTRETTO: ……

REFERENTE ……TELEFONO ……/…….

PRESENZA DEL VETERINARIO

- ☐ L.P.
- ☐ DIPENDENTE MANGIMIFICIO
- ☐ ALTRO

Nome e cognome: ……

DATI DI CHI FORNISCE LE INFORMAZIONI ……..

IN QUALITA' DI ……..

2. CENSIMENTO E DISTRIBUZIONE DEI CONIGLI PRESENTI IN AZIENDA

(1) Femmine in produzione **(2)** Rimonta non in produzione **(3)** Maschi **(4)** Ingrasso **(5)** Coniglietti lattanti

Struttura*:

Categoria	Numero	Con sintomi/lesioni	Sieropositivi
Femmine produzione			
Rimonta non in produzione			
Maschi			
Ingrasso			
Coniglietti lattanti			

Struttura*:

Categoria	Numero	Con sintomi/lesioni	Sieropositivi
Femmine produzione			
Rimonta non in produzione			
Maschi			
Ingrasso			
Coniglietti lattanti			

*Per ogni struttura dell'azienda deve essere compilata una tabella. Per struttura si intende ogni singolo edificio/capannone/tunnel/stanza in cui sono ricoverati ed allevati i CONIGLI. La struttura può essere identificata con numeri progressivi o lettere e deve corrispondere a quanto descritto nella planimetria dell'azienda (vedi 2.1).

3. TIPOLOGIA DELL'AZIENDA

Anno inizio attività:_____

Orientamento produttivo

- ❑ Ciclo chiuso
- ❑ Ciclo aperto

Indirizzo produttivo

- ❑ Riproduzione (solo riproduttori)
- ❑ Ingrasso (solo ingrasso)
- ❑ Misto (riproduzione + ingrasso)
- ❑ Gran parentali

Modalità di allevamento

- ❑ Al chiuso, in capannoni/tunnel e gabbie
- ❑ Banda unica
- ❑ All'aperto, "en plein air o semi plein air"
- ❑ Misto (capannone + plein air)
- ❑ "A terra" con animali tenuti in recinti su lettiera di paglia o su grigliato

Ricoveri

Capannoni ☐
Tunnel ☐
N° totale .....

- ❑ N° posti gabbia femmina (NIDO):_____
- ❑ N° posti gabbia rimonta:_____
- ❑ N° posti per ingrasso:_____
- ❑ N° posti per maschi:_____

Tipo gabbie per ingrasso:

- ❑ Bicellulari
- ❑ Sistema dual-band
- ❑ Gabbia colonia

Tipo ventilazione:
- ❑ Naturale
- ❑ Forzata
  - ❑ Trasversale
  - ❑ Longitudinale
- ❑ Cooling

Ciclizzazione:

- ❑ Durata interparto: _____
- ❑ Ritmo di ciclizzazione: _____

Età allo svezzamento _____ Età alla macellazione _____

Fecondazione
- ❑ Monta naturale
- ❑ Inseminazione artificiale:
  operatore addetto alla I.A.:
  - ❑ aziendale
  - ❑ proveniente da centri specifici

  provenienza del seme: _____
  - ❑ aziendale
  - ❑ proveniente da centri specifici

3.1 PLANIMETRIA

Disegnare schematicamente una mappa relativa alla disposizione dei vari locali di allevamento, segnando al loro interno la distribuzione dei diversi gruppi di animali.
Indicare inoltre:

- l'ubicazione rispetto all'azienda di eventuali allevamenti confinanti specificandone la tipologia
- canali di irrigazione, fonti d'acqua e via di comunicazione

4. PROFILASSI

4.1 Profilassi indiretta

Effettuazione di piani vaccinali per MEV in azienda
☐ No ☐ Si

Schema vaccinale adottato	Tipologia di capi vaccinati (1/2/3/4/5)	Data ultima vaccinazione	Vaccino utilizzato

(1) Femmine in produzione **(2)** Rimonta non in produzione **(3)** Maschi **(4)** Ingrasso **(5)** Coniglietti allo svezzamento

4.2 Profilassi diretta:

L'azienda è dotata di barriere (cancelli, muri di cinta, reti, etc.) che impediscono l'accesso di vettori animati, potenziali veicoli di trasmissione indiretta della malattia (carnivori domestici e selvatici, uccelli, insetti etc. ?
☐ No ☐ Si

Esiste un macello annesso all'azienda?
☐ No ☐ Si

Il carico/scarico animali avviene:
☐ fuori dell'azienda ☐ all'interno dell'azienda

Si effettua la quarantena per animali di nuova introduzione?
☐ No ☐ Si

Esiste una zona in azienda destinata alla disinfezione degli automezzi?
☐ No ☐ Si

Disinfezioni e disinfestazioni:
☐ Utilizzo di disinfettanti. Principio attivo usato, le modalità di utilizzo e la frequenza:

☐ Utilizzo di apparecchiature a pressione (es. pulivapor)?
☐ Pratica di disinfestazione e derattizzazione. Specificare il principio attivo usato, le modalità di utilizzo e la frequenza:

☐ Presenza reti antizanzare alle finestre?

☐ Esiste una zona filtro (anticamera, spogliatoio ecc)

☐ Utilizzo di materiale monouso (copri-abiti, tute, calzari, etc.)

☐ Presenza della cella frigorifera di raccolta dei morti (indicare la collocazione sulla mappa, vedi punto 3.1)

Modalità di raccolta delle deiezioni:
☐ Fossa con raschiatore ☐ Nastri trasportatori
☐ Fossa semipermanente ☐ Fossa permanente

Frequenza pulizia _____ Data ultima pulizia _____

Modalità di smaltimento delle deiezioni:
☐ in campi di proprietà
☐ in altri campi convenzionati
☐ altro (specificare): _____

☐ L'azienda dispone di mezzi propri per il trasporto di animali. Specificare il tipo di autoveicolo e la targa_____

☐ Il proprietario e/o i familiari e/o i dipendenti hanno rapporti con altre aziende cunicole. Compilare il seguente schema:

Nome e cognome	**Azienda correlata**	
	Codice	**Proprietario/indirizzo**

☐ Presenza di allevamenti di conigli nel raggio di 10km. Compilare il seguente schema:

Denominazione Azienda	**Codice**	**Indirizzo (Via, N., Comune)**	**Consistenza**	**Distanza (in metri)**

☐ Possibilità di contatto con altri animali
- ☐ cani
- ☐ gatti
- ☐ animali selvatici (specificare _____)
- ☐ uccelli
- ☐ altro_____

5. MOVIMENTAZIONI

***Le categorie produttive sono le seguenti: **(1)** Femmine in produzione **(2)** Rimonta non in produzione **(3)** Maschi **(4)** Ingrasso **(5)** Coniglietti lattanti

5.1 Introduzione di animali *(negli 30gg precedenti)*

N° e categoria di animali*	Data Introduzione	Provenienza (codice allevix e denominazione)	Vaccinati (si/no, malattia e data)	Mezzo di trasporto (tipo-targa)

5.2 Uscita di animali *(nei 30gg precedenti)* verso altri allevamenti, fiere, mostre, mercati o per macellazione

N° e categoria di animali*	Data Uscita	Destinazione (codice allevix e denominazione)	Vaccinati (si/no, malattia e data)	Mezzo di trasporto (tipo-targa)

5.3 Movimento di automezzi *(nelle due settimane precedenti)*

(**A**) Trasporto animali **(B)** Trasporto mangime, **(C)** Raccolta animali morti **(Altro**) Specificare

Data	Mezzo trasporto (A/B/C/altro)	Denominazione Ditta	Recapito Tel/Fax	N. Targa motrice	N Targa rimorchio	Trasportatore (Ditta)	Autista	Recapito telefonico

5.4 Movimento di persone *(nelle 4 settimane precedenti)*
(**A**) Veterinario, (**B**) Tecnico mangimista, (**C**) Addetto alla IA/Commerciante di seme, (**D**) Altro allevatore, (**Altro**) Altre persone (specificare)

Data	Cognome e Nome	Qualifica (A/B/C/D /Altro)	N° telefono	Allevamento precedentemente visitato		
				Denom. Azienda	Codice Allevix	Indirizzo

6. STATO SANITARIO DELL'ALLEVAMENTO

6.1 Sintomatologia riferibile a MEV clinicamente manifesta
(vedi "Motivo dell'effettuazione dell'indagine")
- ❑ No
- ❑ Si
  - ❑ In atto al momento della visita
  - ❑ Segnalata dal veterinario / proprietario

Data inizio sintomatologia clinica riferibile MEV ...../...../.....

Sintomi o lesioni osservate: .....….....
- ☐ Apatia e disoressia
- ☐ Segni nervosi (eccitazione con emissione di grida, tremori, disturbi di coordinazione, decubito laterale)
- ☐ Difficoltà respiratorie
- ☐ Febbre
- ☐ Fuoriuscita liquido siero-emorragico dalle narici
- ☐ Altro .....

Trattamenti effettuati _____
_____

Pregressa positività per MEV
- ❑ No
- ❑ Si data_____

Trattamenti effettuati _____
_____

6.2 Patologie presenti comunemente in azienda
Riproduttori
- ❑ No
- ❑ Si quali_____

Ultimo referto di laboratorio:
Data _____

Risultati_____
_____

Ingrasso
- ❑ No
- ❑ Si quali_____

Ultimo referto di laboratorio:
Data _____
Risultati_____
_____

6.3 Tabella di mortalità aziendale

Mortalità e riforma di femmine in produzione
Mortalità totale annuale in % _____
Riforma totale annuale in % _____

Mortalità e riforma di femmine in produzione dal posizionamento per il parto-svezzamento
Indicare i dati di mortalità riferiti alle ultime 4 settimane precedenti la visita

SETTIMANA DAL	**DO***	**LU**	**MA**	**ME**	**GI**	**VE**	**SA**	**TOT**
***Eliminati** / **Morti**								

Mortalità nei lattanti e nell'ingrasso
Rispetto alla mortalità media nei lattanti (dalla nascita allo svezzamento) e nell'ingrasso (dallo svezzamento alla macellazione), si è registrato un incremento in concomitanza con la comparsa di sintomi riferibili a MEV?
NO ☐ SI ☐

In caso di risposta affermativa, il numero di morti giornaliero per ogni categoria nell'arco di tempo considerato

Data	**Lattanti**	**Ingrasso**		**Rimonta**
		35-55	**56-fine ciclo**	

7. PRELIEVO CAMPIONI E INDAGINI DIAGNOSTICHE

Sono stati eseguiti dei campioni per accertamenti diagnostici nei 30 giorni precedenti
NO ☐ SI ☐

Quali esami diagnostici sono stati eseguiti e quali sono gli esiti ?

8. NOTE E CONCLUSIONI

(da intendersi come informazioni supplementari non comprese nel questionario, nonché la formulazione di una o più ipotesi sulla origine della infezione)

ALLEGATO 3

AZIENDA ASL/ULSS _____

DIPARTIMENTO DI PREVENZIONE
SERVIZIO VETERINARIO

Spett.le
Servizio Veterinario ASL

Allegato al certificato sanitario n°_____

del _____

ATTESTAZIONE SANITARIA INTEGRATIVA

PER L'ESPORTAZIONE VERSO PAESI TERZI

Il/La sottoscritto/a Dott./Dott.ssa _____

Veterinario Ufficiale, attesta che i conigli inviati al macello _____

_____

in data _____ soddisfano le seguenti condizioni:

a) *gli animali dai sono stati allevati in Italia durante i tre mesi che precedono la macellazione o dalla loro nascita*
b) *provengono dall'allevamento _____ codice _____, non soggetto a divieto di spostamento a causa di malattie della lista dell'OIE trasmissibile alla rispettiva specie animale*

Fatto a:

IL VETERINARIO UFFICIALE

ALLEGATO 4

REPUBBLICA ITALIANA

Regione _____ ASL/ULSS _____ - Servizio Veterinario

CERTIFICATO VETERINARIO
per prodotti non commestibili di origine animali destinati all'importazione in paesi terzi

HEALTH CERTIFICATE
CERTIFICATE OF INSPECTION AND QUARANTINE
for inedible products of animal origin meant to be imported in third Countries

Prot. N°_____

Exporting Country:	**REPUBBLICA ITALIANA**
Ministry:	**Ministero della Sanità**
Department concerned :	**Regione _____ ASL/ULSS_____ Servizio veterinario**

I. ORIGINE DELLA MERCE / *PLACE OF ORIGIN*

Indirizzo e numero di autorizzazione veterinaria dello stabilimento di macellazione
Address and veterinary approval number of the slaughterhouse

_____

II. DESTINAZIONE DELLA MERCE / *PLACE OF DESTINATION*

Nome e indirizzo dello speditore / *Name and address of the consignor*

_____

Nome e indirizzo del destinatario / *Name and address of consignee*

_____

Mezzo di trasporto / *Means of transport container N°* _____

III. IDENTIFICAZIONE DELLA MERCE / *GOODS IDENTIFICATION*

Descrizione della merce / *Description of products*

Pelli di coniglio essicate/congelate / *Dry/frozen rabbit pelts*

Imballaggio / *Packing*

Film di plastica / *Plastic film*

Contrassegno / *Marks and numbers*

N° dei colli / *Nr. Of pieces or packages: N°* _____

Peso lordo / *Gross weight. Kg* _____

Peso netto / *Net weight: Kg* _____

Lett. credito / *Doc. credit N°* _____

IV. INFORMAZIONI SANITARIE / *HEALTH ATTESTATION*

Gli animali dai quali è stata ottenuta la merce / *The animals from which these products were obtained*:

a) sono stati tenuti nel Paese di spedizione durante i tre mesi che precedono la macellazione o dalla loro nascita / *have remained in the exporting country during the three months before their slaughter or from their birth date.*

b) provengono da allevamenti non soggetti a divieto di spostamento a causa di malattie della lista dell'OIE trasmissibile alla rispettiva specie animale / *they are coming from rabbit farms not subjected to the travel ban because of any OIE list disease that can be transmitted to the same species.*

c) prima e dopo la macellazione sono stati sottoposti a esame ante e post-mortem da parte dell'Autorità veterinaria / *the animals have been inspected by government veterinarian before and after slaughtering.*

In accordo con quanto previsto dal OIE Terrestrial Animal Health Code (Art. 13.2.13), le pelli sono state sottoposte, a trattamento di essicazione (o congelamento) per almeno un mese e inattivazione con trattamenti spray di formalina al 3% o mediante fumigazione eseguita entro i 7gg prima della spedizione. / *According to the requirements of OIE Terrestrial Animal Health Code (Art. 13.2.13) rabbit pelts were subjected to a drying (or frozen) treatment for at least one month and a formalin-based treatment by spraying at a 3 percent concentration, or by fumigation carried out, not more than seven days prior to shipment.*

Fatto a / *Issued at* _____

Il / *on (d.m.y)* _____

IL VETERINARIO UFFICIALE
THE OFFICIAL VETERINARIAN

ALLEGATO 5

LINEE GUIDA PER LA PULIZIA E LE DISINFEZIONI IN ALLEVAMENTO

Nella disinfezione dei locali di allevamento l'impiego di disinfettanti costituisce un procedimento complementare alla pulizia e, dove possibile, del vuoto sanitario. Il vuoto sanitario nell'allevamento cunicolo è applicato, per motivi tecnici, solo in un numero limitato di allevamenti. Questo perché l'allevamento del coniglio è fondamentalmente a ciclo chiuso, salvo quei casi, tipici della filiera integrata, in cui la fase ingrasso avviene separatamente dall'allevamento dei riproduttori.
In corso di focolaio di MEV/RHD bisogna quindi tenere presente che in un allevamento ci possiamo trovare di fronte a due situazioni differenti:
1) disinfezione dell'allevamento in presenza di animali, situazione più frequente;
2) disinfezioni ad allevamento vuoto, evenienza più rara.

1) Lo svuotamento totale dei locali consente certamente una disinfezione più rigorosa in quanto:
   - si possono rimuovere tutte le attrezzature (mangiatoie, abbeveratoi, gabbie, nidi ecc.);
   - si può operare una pulizia a fondo con raschiamento delle pareti, dei pavimenti e degli infissi;
   - si possono impiegare dei prodotti disinfettanti non utilizzabili in presenza di animali.

2) La disinfezione praticata in un allevamento non vuoto con presenza di animali presenta alcune difficoltà:
   - la pulizia è di fatto parziale;
   - la presenza residua di materiale organico può disattivare alcuni principi attivi del prodotto disinfettante;
   - possono essere usati solo disinfettanti non tossici sugli animali.

Le operazioni di pulizia e disinfezione delle aziende infette devono essere condotte secondo i principi e le procedure di seguito elencati:

a) Devono essere effettuate sotto controllo e conformemente alle istruzioni impartite dal veterinario ufficiale; devono essere documentate nel registro dell'azienda o del veicolo e, laddove ne sia richiesto il riconoscimento ufficiale, certificate dal veterinario ufficiale responsabile dei controlli;
b) I disinfettanti devono essere prodotti autorizzati e/o registrati e vanno utilizzati conformemente alle raccomandazioni del fabbricante ove fornite, o alle istruzioni del veterinario ufficiale e/o alle eventuali istruzioni del Ministero;
c) La scelta dei disinfettanti e delle procedure di disinfezione è effettuata tenendo conto della natura delle aziende, dei veicoli e degli oggetti da trattare;
d) Occorre prevedere la pulizia, la disinfezione di apparecchiature, impianti, attrezzi o di tutto ciò che potrebbe essere contaminato, compresi gli attrezzi e le macchine utilizzati per le operazioni di pulizia e disinfezione stesse;
e) E' anche prevista la pulizia e la disinfezione dei veicoli utilizzati per il trasporto e dal personale. Gli automezzi e i veicoli contaminati non possono lasciare l'azienda prima di essere decontaminati: si deve pulire e disinfettare comunque l'esterno, incluse le ruote e le parti sottostanti il veicolo.
f) Le condizioni di utilizzo dei detergenti e dei disinfettanti devono essere tali da non alterarne l'efficacia; occorre, in particolare, rispettare i parametri tecnici indicati dal fabbricante, quali la pressione, la temperatura minima e il tempo di contatto necessario;
g) In caso di focolaio di malattia infettiva come la MEV/RHD la disinfezione è attuata in "continuo". I trattamenti devono quindi essere ripetuti periodicamente, in funzione del ciclo attuato, con rotazione delle attrezzature e dove possibile, delle strutture.

Pulizia
Va attuata prima di eseguire la disinfezione per evitare che la sostanza organica interferisca con il contatto fra disinfettante e bersaglio della disinfezione (virioni):

- Le attrezzature asportabili (gabbie, scivoli in lamiera e nidi vuoti) devono essere pulite, asportando sporcizia e materiale organico (residui di feci, peli, polvere, ragnatele), ricorrendo all'utilizzo di spazzole e raschietti, e se necessario di un detergente e/o prodotto sgrassante, e lavate con getti d'acqua a forte pressione;

- I locali devono essere puliti, anche in questo caso cercando di rimuovere il più possibile da muri, pavimenti, soffitti il materiale organico e la sporcizia (residui di feci, peli, polvere ragnatele). Particolare attenzione dovrà essere rivolta alle commessure fra il pavimento e le pareti e gli angoli. Se ci sono delle crepe o delle manutenzioni da compiere il proprietario dovrà effettuarle. L'ordine raccomandato per la pulizia e per la disinfezione dovrebbe essere: soffitto, pareti, pavimento e quest'ordine dovrebbe essere mantenuto in ciascun edificio. La pulizia è eseguita rimuovendo prima il sudiciume in modo meccanico (es. raschiatori, spazzole, scope), poi si procede ad umidificare le superfici per almeno 30 minuti per ammorbidire la materia organica più secca, quindi si impiega acqua calda sotto pressione, eventualmente miscelata a detergenti, per rimuovere i residui. In caso di utilizzo di detergenti, questi devono avere un tempo di contatto per un tempo sufficiente e devono poi essere rimossi mediante risciacquo. Il risciacquo deve essere completo per evitare che residui di detergenti possano vanificare la successiva azione disinfettante.
- Le fosse, prima della disinfezione devono essere svuotate dal letame, irrorate di acqua e lavate.

Disinfezione
Nel caso in cui l'allevamento sia costituito da più unità (capannoni) è raccomandabile operare uno svuotamento a rotazione per attuare così una pulizia e disinfezione radicale e accurata degli ambienti e delle attrezzature (gabbie, nidi, linee acqua e alimento, fosse etc). A capannone vuoto, provvedere alla rimozione del materiale organico e lavare accuratamente con un'idropulitrice a caldo. Quando l'ambiente è completamente asciutto, provvedere a una disinfezione meticolosa. Dopo disinfezione, non risciacquare e lasciare agire il disinfettante per almeno 24 ore.

La disinfezione può essere effettuata con metodi fisici e chimici e va attuata con metodi e prodotti aventi proprietà virulicide, preferibilmente non corrosivi per le attrezzature, aventi un buon potere penetrante e non disattivati da polverosità e da sostanze organiche. Inoltre, in funzione delle condizioni d'uso (allevamenti vuoti o con presenza di animali) i prodotti utilizzati devono essere privi di tossicità per gli animali e quindi registrati per l'impiego anche in presenza di animali.

Disinfezione con metodi fisici.
- Fiamma diretta (es. lampada da saldatore) per eliminare peli e lanugine;
- Calore secco (es. lanciafiamme) per la disinfezione di pavimenti in cemento, muri e piazzali in terra battuta;
- Calore umido (es. idropulitrice a pressione).

I composti chimici disinfettanti più attivi nei confronti del virus della MEV/RHD sono:

Complesso potassio perossimonosolfato in formulazione multiattiva
- Utilizzato per locali, attrezzatura oggetti e utensili, pediluvi, aria
- Soluzione all'1%.
- Buona attività contro tutti i virus
- Innocuo in presenza di animali

Composti a base di Cloro
- Efficaci per la disinfezione dei sistemi di conduttura dell'acqua (acque dolci)
- Corrosivi
- Grande velocità di azione
- Inattivati con materia organica ed acque dure
- Poca resistenza
- Nessuna azione detersiva

Iodio e Iodofori
- Indicati per disinfettare gli stivali, attrezzature
- Possibile utilizzo in presenza di animali
- Concentrazione d'uso 1-2% p.a.
- Elevata azione detergente
- Grande velocità d'azione
- Moderatamente attivi in presenza di materia organica.
- Né tossici né corrosivi ma dall'odore penetrante
- Perdono attività rapidamente dopo la preparazione

- Perdono colore con la perdita di attività
- Tendono a macchiare le superfici

Composti a meccanismo d'azione ossidante (acido acetico e acqua ossigenata)
- Indicati per disinfezione di locali, attrezzature, pediluvi, aria
- Ampio spettro di azione
- Relativamente stabili in presenza di materiale organico
- Elevata velocità di azione
- Presenti in commercio soluzioni al 40% di acido acetico, acqua ossigenata e acido peracetico
- Utilizzare fino a max 40°C, esplosivi a T° >70°C
- Corrosivi

Idrossido di sodio (soda caustica)
- Ottimo per disinfezione di pavimenti
- Usato alla concentrazione di 1-5% in acqua calda (60-70%)
- Ha anche proprietà detergenti
- Corrosivo per metalli e caustico
- Da utilizzarsi solo in assenza di animali
- Necessità di abbondante risciacquo dopo l'uso
- Possibile miscela con latte di calce

Carbonato di sodio (lisciva o soda del commercio)
- Utilizzato per mezzi di trasporto e strutture
- Buona attività su virus ma scarso battericida
- Usato in soluzione acquosa al 5-8%
- Da utilizzare a T°C di 55-60°
- Buona attività detergente

Ossido di calcio (calce viva)
- Indicato per trattare il punto di accesso ai ricoveri, le scarpe, le ruote degli automezzi, gli attrezzi e le concimaie
- Usato come polvere

Idrossido di calcio (calce idrata o spenta)
- Indicato per la disinfezione "ordinaria" di liquami e fosse
- Si ottiene miscelando la calce viva (100g) con acqua (40 ml)
- Utilizzare subito dopo la preparazione

Idrato di calcio 20% (latte di calce)
- Utilizzato per la disinfezione "ordinaria" delle pareti e pavimenti
- Preparazione: 1 kg di calce viva sminuzzata in 750ml di acqua, mescolare e dopo 30 min aggiungere 4 litri di acqua.

Acido citrico
- Lavaggio mani, corpo e indumenti
- Soluzione al 0,2%

Benzalconio cloruro
- Disinfettante mani