

# I. Disposiciones generales

## MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

**24376** REAL DECRETO 1025/1993, de 25 de junio, por el que se establecen medidas para la lucha contra la influenza aviar.

Por la presente norma el Gobierno transpone al ordenamiento jurídico español la Directiva 92/40/CEE, del Consejo, de 19 de mayo, por la que se establecen medidas comunitarias para la lucha contra la influenza aviar, y ello de acuerdo con la competencia atribuida al Estado en materia de bases y coordinación general de la sanidad por el artículo 149.1.16 de la Constitución.

La influenza aviar es una enfermedad de las aves de gran patogenicidad que puede adquirir rápidamente carácter epizootico y cuya aparición en una explotación representa una traba para la comercialización de aves de corral y huevos al igual que compromete seriamente la rentabilidad de las explotaciones avícolas.

Por ello es necesario establecer medidas de lucha contra la misma, con objeto de garantizar el desarrollo nacional del sector de las aves de corral y de contribuir a la protección de la salud animal.

Estas medidas están encaminadas a impedir su propagación, llevando a cabo un control estricto de movimientos de animales y productos con el fin de erradicar la enfermedad rápidamente y con los mínimos riesgos sanitarios.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 25 de junio de 1993,

### DISPONGO:

#### Artículo 1.

El presente Real Decreto establece las medidas de lucha contra la influenza aviar aplicables en caso de que esta enfermedad se declare en las aves de corral.

Esta norma no será de aplicación cuando se detecte la influenza aviar en otras aves, aunque en estos casos la autoridad competente deberá informar al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de las medidas que haya adoptado al respecto, para su notificación a la Comisión de las Comunidades Europeas, a través del cauce correspondiente.

#### Artículo 2.

A efectos del presente Real Decreto, se utilizarán las definiciones del artículo 2 del Real Decreto 1317/1992,

de 30 de octubre, relativo a las condiciones de sanidad animal que regulan los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.

Además se entenderá por:

a) Ave de corral infectada:

1.º Cualquier ave de corral en la que se haya detectado la influenza aviar mediante su examen por un laboratorio autorizado tal y como se define en el anexo III.

2.º En el caso de un segundo brote, o de brotes sucesivos, cualquier ave de corral en la que se hayan encontrado signos clínicos o lesiones «postmortem» propios de la influenza aviar.

b) Ave de corral sospechosa de estar infectada: toda ave de corral con signos clínicos o lesiones «postmortem» que puedan hacer sospechar justificadamente la presencia de la influenza aviar o en la que se haya comprobado la presencia del subtipo H5 o H7 del virus de la influenza aviar.

c) Ave de corral sospechosa de estar contaminada: toda ave de corral que haya podido estar, directa o indirectamente, en contacto con el virus de la influenza aviar o con el subtipo H5 o H7 del virus de la influenza aviar.

d) Autoridad competente: los órganos competentes de las Comunidades Autónomas.

e) Veterinario oficial: el veterinario designado por la autoridad competente.

#### Artículo 3.

Toda sospecha de influenza aviar deberá notificarse obligatoria e inmediatamente a la autoridad competente.

#### Artículo 4.

1. Cuando en una explotación haya aves de corral sospechosas de estar infectadas por la influenza aviar el veterinario oficial realizará inmediatamente una investigación para confirmar o descartar la presencia de esta enfermedad; la investigación deberá incluir tomas de muestras adecuadas para analizarlas en el laboratorio.

2. Cuando se notifique la sospecha de infección la autoridad competente pondrá la explotación bajo vigilancia oficial y ordenará:

a) La realización de un censo de todas las aves de corral de la explotación en el que se precise, por categorías, el número de aves de corral muertas, cuántas presentan síntomas clínicos y cuántas no. El censo deberá estar actualizado para tener en cuenta las aves nacidas y muertas durante el período de sospecha y presentarse cuando se solicite, pudiendo ser controlado en cada visita.

b) El aislamiento de todas las aves de corral de la explotación en sus locales habituales o en cualquier otro lugar, con el fin de evitar el contacto con otras aves.

c) Que se prohíba la entrada y salida de aves de corral en la explotación.

d) Someter a su autorización:

1.º Todo movimiento de personas, animales o vehículos cuyo destino u origen sea la explotación.

2.º Todo movimiento de carne o canales de aves de corral, piensos, material, residuos, deyecciones, cama de paja, estiércol o cualquier otro elemento capaz de transmitir la influenza aviar.

e) Que se prohíba la salida de huevos de la explotación, salvo aquellos enviados directamente a un establecimiento autorizado para la fabricación o el tratamiento de ovoproductos y que sólo puedan ser transportados con su autorización, que deberá cumplir los requisitos establecidos en el anexo I.

f) La utilización de medios de desinfección apropiados en las entradas y salidas de la explotación y en los locales donde se encuentren las aves de corral.

g) Que se realice una investigación epidemiológica con arreglo a lo dispuesto en el artículo 7.

3. Hasta que entren en vigor las medidas oficiales contempladas en el apartado anterior, el propietario o avicultor de toda explotación en la que se sospeche la presencia de la enfermedad, adoptará todas las medidas que garanticen el cumplimiento de las disposiciones contempladas en dicho apartado, con exclusión del párrafo g).

4. La autoridad competente podrá extender las medidas previstas en el apartado 2 a otras explotaciones que por su ubicación, características o contactos con la explotación en que se sospeche la existencia de la enfermedad, permitan suponer una posible contaminación.

5. Las medidas contempladas en los apartados 1 y 2, dejarán de aplicarse únicamente cuando el veterinario oficial descarte cualquier sospecha de influenza aviar.

#### Artículo 5.

1. Cuando se confirme oficialmente que en una explotación se ha declarado la influenza aviar, la autoridad competente, además de las medidas mencionadas en el apartado 2 del artículo anterior, ordenará las siguientes:

a) El sacrificio inmediato de todas las aves de corral que se hallen en la explotación y la destrucción de las aves de corral muertas o sacrificadas y de todos los huevos. Estas operaciones se efectuarán de manera que se limite al máximo el riesgo de propagación de la enfermedad.

b) La destrucción o el tratamiento apropiado de todas las materias o residuos, como piensos, carnes o estiércol, que puedan estar contaminados. Este tratamiento deberá realizarse según las instrucciones del veterinario oficial para garantizar la destrucción total del virus de la influenza aviar.

c) En la medida de lo posible, la búsqueda y destrucción de la carne de las aves de corral que hayan sido sacrificadas durante el supuesto período de incubación de la enfermedad.

d) La búsqueda y destrucción de los huevos para incubar puestos durante el supuesto período de incubación que hayan salido de la explotación, sometiendo a vigilancia oficial las aves de corral que hayan nacido de esos huevos; asimismo en la medida de lo posible la búsqueda y destrucción de los huevos destinados al consumo puestos durante el supuesto período de incubación que hayan salido de la explotación, salvo en el

caso de que hayan sido previamente desinfectados de forma correcta.

e) Después de haberse llevado a cabo las operaciones indicadas en los párrafos a) y b), la limpieza y desinfección, con arreglo a lo dispuesto en el anexo II, de los edificios donde se alojen las aves de corral y de sus alrededores, de los vehículos de transporte y de todo material que pueda estar contaminado.

f) La realización de una investigación epidemiológica con arreglo a lo dispuesto en el artículo 7.

2. Después de realizar las operaciones de limpieza y desinfección, será necesario un período mínimo de veintidós días para volver a introducir aves de corral en la explotación.

3. La autoridad competente podrá aplicar las medidas previstas en el apartado 1 a otras explotaciones cuando por su ubicación, características o contactos con la explotación en la que se haya confirmado la enfermedad permitan sospechar una posible contaminación.

#### Artículo 6.

Cuando las explotaciones estén formadas por dos o más manadas independientes, la autoridad competente, podrá eximir de las medidas enunciadas en el apartado 1 del artículo 5 a las manadas sanas de una explotación infectada, siempre que el veterinario oficial garantice que dichas manadas permanecen completamente independientes desde el punto de vista de su alojamiento, mantenimiento y alimentación, de modo que no haya peligro de transmisión del virus.

#### Artículo 7.

1. La investigación epidemiológica a que se ha hecho referencia en los artículos precedentes estudiará los siguientes aspectos:

a) Posible origen de la influenza aviar en la explotación y período de su presencia en la misma.

b) Localización de las demás explotaciones que contengan aves de corral susceptibles de infección o contaminación a partir del mismo foco.

c) Movimientos de personas, aves de corral u otros animales, vehículos, huevos, carne, canales y cualquier utensilio o material que haya podido transmitir el virus de la influenza aviar a la explotación afectada o propagarlo a partir de la misma.

2. De acuerdo con las normas que, en su caso, establezcan las autoridades comunitarias, se creará un centro de crisis de ámbito nacional que coordine las medidas para erradicar rápidamente la enfermedad y que realice el estudio epidemiológico.

#### Artículo 8.

1. Cuando el veterinario oficial disponga de indicios para sospechar la contaminación de aves de corral de una explotación debida a movimientos de personas, animales o vehículos o a cualquier otra circunstancia, la explotación afectada se someterá a control oficial con arreglo a lo dispuesto en el apartado 2.

2. El control oficial tendrá como finalidad detectar inmediatamente cualquier indicio de influenza aviar, llevar a cabo el censo de las aves de corral, controlar sus movimientos y, en su caso, aplicar las medidas establecidas en el apartado 3.

3. Cuando una explotación esté sometida al control oficial de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 y 2, la autoridad competente prohibirá la salida de las aves de corral de la explotación cuando no sea

para su transporte directo a un matadero bajo control oficial para su sacrificio inmediato. Antes de que pueda autorizarse tal salida, el veterinario oficial deberá haber efectuado un examen clínico de todas las aves de corral que demuestre que la explotación está libre de influenza aviar. Las restricciones de movimientos mencionadas en el presente artículo se aplicarán durante un período de veintidós días a partir de la última fecha en que pueda haberse producido la contaminación; no obstante, estas restricciones se aplicarán durante un período mínimo de siete días.

4. Cuando considere que las condiciones lo permiten, la autoridad competente podrá limitar la aplicación de las medidas establecidas en el presente artículo a una parte de la explotación y a las aves de corral que se hallen en ésta, siempre que hayan sido alojadas, mantenidas y alimentadas de forma totalmente separada y por diferente personal.

#### Artículo 9.

1. Cuando el diagnóstico de la influenza aviar se haya confirmado oficialmente, la autoridad competente delimitará alrededor de la explotación infectada, una zona de protección de un radio mínimo de 3 Km., englobada en una zona de vigilancia de un radio mínimo de 10 Km.

Para la delimitación de estas zonas deberán tenerse en cuenta aquellos factores geográficos, administrativos, ecológicos y epizootiológicos relacionados con la influenza aviar, así como las estructuras de control.

2. En la zona de protección se aplicarán las siguientes medidas:

a) Localización de todas las explotaciones con aves de corral.

b) Visitas periódicas a todas las explotaciones con aves de corral, con exámenes clínicos de éstas y, en su caso, toma de muestras para su examen en laboratorio; se llevará un registro de visitas y resultados de los exámenes.

c) Mantenimiento de todas las aves de corral en su alojamiento habitual o en cualquier otro lugar que permita aislarlas.

d) Utilización de sistemas de desinfección apropiados en las entradas y salidas de las explotaciones.

e) Control de los desplazamientos dentro de la zona de las personas que manipulen aves de corral, sus canales y huevos, así como de los vehículos utilizados para su transporte, estando prohibido el transporte de las aves, excepto el tránsito por las carreteras y líneas férreas más importantes.

f) Prohibición de sacar aves de corral y huevos para incubar de la explotación donde se encuentren. No obstante, la autoridad competente podrá autorizar el transporte:

1.º De aves para su sacrificio inmediato, preferentemente a un matadero situado en la zona infectada, o, de no ser posible, a uno situado fuera de ésta y designado por la autoridad competente. La carne resultante deberá llevar la marca sanitaria especial establecida en el apartado 1 del artículo 5 del Real Decreto 1317/1992.

2.º De pollitos de un día de edad o de pollitas maduras para la puesta a una explotación situada dentro de la zona de vigilancia y que no tenga otras aves de corral. Esta explotación estará sometida al control oficial establecido en el apartado 2 del artículo 8.

3.º De huevos destinados a una incubadora designada por la autoridad competente. Los huevos y sus envases deberán desinfectarse antes de ser enviados.

Los desplazamientos indicados en este apartado, deberán ser realizados directamente bajo control oficial

y únicamente se autorizarán después de que el veterinario oficial haya efectuado una inspección sanitaria de la explotación. Los medios de transporte empleados deberán limpiarse y desinfectarse antes y después de su utilización.

g) Prohibición de retirar o esparcir sin autorización el estiércol de las aves de corral o sus camas de paja.

h) Prohibición de celebrar ferias, mercados, exposiciones y demás concentraciones de aves de corral o de cualquier otro tipo de aves.

3. Las medidas aplicadas en la zona de protección se mantendrán al menos durante veintidós días después de que se hayan efectuado en la explotación infectada las operaciones preliminares de limpieza y desinfección con arreglo a lo dispuesto en los apartados c) y d) del artículo 10. Cuando se levanten esas medidas, la zona de protección pasará a formar parte de la zona de vigilancia.

4. En la zona de vigilancia se aplicarán las siguientes medidas:

a) Localización de todas las explotaciones de la zona con aves de corral.

b) Control de los desplazamientos de las aves de corral y de los huevos para incubar dentro de la zona.

c) Prohibición de sacar aves de corral fuera de la zona durante los quince primeros días, excepto para enviarlas directamente a un matadero situado fuera de la zona de vigilancia y designado por la autoridad competente, en cuyo caso la carne de estas aves deberá llevar la marca sanitaria especial establecida en el artículo 5 del Real Decreto 1317/1992.

d) Prohibición de sacar huevos para incubar fuera de la zona de vigilancia, excepto para su envío a una incubadora designada por la autoridad competente. Antes de ser enviados, los huevos y sus envases deberán ser desinfectados.

e) Prohibición de sacar estiércol de aves de corral o sus camas de paja fuera de la zona.

f) Prohibición de celebrar ferias, mercados, exposiciones y demás concentraciones de aves de corral o de cualquier otro tipo de aves.

g) Sin perjuicio de las disposiciones contempladas en los párrafos b) y c), prohibición de transportar aves de corral, exceptuando el tránsito por las carreteras y líneas férreas más importantes.

5. Las medidas aplicadas en la zona de vigilancia se mantendrán al menos durante treinta días después de haberse realizado en la explotación infectada las operaciones preliminares de limpieza y desinfección con arreglo a lo dispuesto en el anexo II.

6. En caso en que la zona de protección o la de vigilancia se extiendan a Francia, Portugal o Andorra los órganos competentes de las Comunidades Autónomas lo notificarán al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación a efectos de que pueda establecerse la oportuna colaboración con dichos Estados, a través de cauce correspondiente, en la delimitación de tales zonas.

#### Artículo 10.

Las autoridades competentes adoptarán las medidas oportunas para:

a) Establecer las normas que le permitan controlar los desplazamientos de huevos y de aves de corral.

b) Recibir información detallada de dichos desplazamientos por parte del avicultor, transportista o comerciante de aves de corral y huevos.

c) Autorizar oficialmente los desinfectantes a utilizar, así como su concentración.

d) Efectuar las operaciones de limpieza y desinfección según el procedimiento previsto en el anexo II y según las instrucciones del veterinario oficial.

e) Adoptar las medidas necesarias para que todos los habitantes de la zona de protección y de vigilancia estén completamente informados de las restricciones vigentes y se atengan a todas las disposiciones impuestas para aplicar adecuadamente las medidas correspondientes.

#### Artículo 11.

Las tomas de muestras y los análisis de laboratorio que se efectúen para detectar el virus de la influenza aviar deberán efectuarse con arreglo a las disposiciones del anexo III.

#### Artículo 12.

1. El laboratorio nacional de referencia para influenza aviar será el indicado en el anexo IV y tendrá las siguientes funciones:

a) Realizar la evaluación de la patogenicidad de los virus de la influenza que se hayan aislado, con arreglo al capítulo 7 del anexo III, y la identificación de los subtipos H5 o H7 del virus de la influenza aviar.

b) Controlar los reactivos utilizados por los laboratorios regionales.

c) Controlar las vacunas autorizadas para verificar su conformidad con las especificaciones contempladas en la autorización de comercialización.

2. El laboratorio nacional indicado en el anexo IV se encargará de la coordinación de las normas y los métodos de diagnóstico de la influenza aviar, el uso de reactivos y el control de vacunas. A tal fin:

a) Podrá proporcionar a otros laboratorios reactivos para el diagnóstico.

b) Controlará la calidad de todos los reactivos de diagnóstico utilizados en el territorio nacional.

c) Organizará periódicamente pruebas comparativas.

d) Mantendrá aislados virus de la influenza aviar recogidos de casos confirmados en el territorio nacional.

e) Confirmará los resultados positivos obtenidos en otros laboratorios de diagnóstico.

3. Habrá una conexión entre el laboratorio nacional indicado en el anexo IV y el laboratorio comunitario de referencia mencionado en el artículo 13.

#### Artículo 13.

El laboratorio comunitario de referencia para la influenza aviar, es el indicado en el anexo V, y sus competencias y funciones son las que figuran en dicho anexo.

#### Artículo 14.

1. La vacunación contra la influenza aviar sólo podrá realizarse con vacunas inscritas en el Registro de Especialidades Farmacéuticas como medicamentos veterinarios y como complemento de las medidas de control que se adopten cuando se declare la enfermedad siempre que sea autorizada, en su caso, por la Comisión.

2. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, la autoridad competente podrá decidir llevar a cabo la vacunación de emergencia en la zona alrededor del foco, previa comunicación al Ministerio de Agricultura, Pesca

y Alimentación, para su notificación a la Comisión, a través del cauce correspondiente.

3. Cuando la vacunación de emergencia esté autorizada en una parte limitada del territorio nacional, el estatuto del resto del territorio no se verá afectado, siempre que se apliquen las normas de inmovilización de los animales vacunados durante un período que será determinado, en su caso, por la Comisión.

#### Artículo 15.

1. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación preparará un plan de urgencia en coordinación con las Comunidades Autónomas en el que se especifique las medidas que deberán aplicarse a escala nacional en caso de que se registre brotes de influenza aviar.

Este plan será sometido, en su caso, a la Comisión, a través del cauce correspondiente para su aprobación, y deberá permitir que el personal adecuado dotado del equipo y material necesario, acceda a las instalaciones para la rápida y eficaz erradicación del brote.

2. El plan de urgencia deberá de elaborarse de acuerdo con los criterios que figuran en el anexo VI.

#### Artículo 16.

En el supuesto de que expertos de la Comisión realicen inspecciones sobre el terreno para verificar el cumplimiento del presente Real Decreto, por parte de la autoridad competente y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en su caso, se les facilitará la asistencia necesaria para el desempeño de sus funciones.

#### Disposición adicional única.

La presente disposición se dicta al amparo del artículo 149.1.16 de la Constitución sobre competencia exclusiva del Estado en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

#### Disposición final primera.

Se faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación para dictar, en el ámbito de sus competencias, las disposiciones necesarias para el cumplimiento y aplicación de lo dispuesto en el presente Real Decreto.

#### Disposición final segunda.

El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 25 de junio de 1993.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación,  
PEDRO SOLBES MIRA

#### ANEXO I

**Autorización para extraer huevos de una explotación que esté sujeta a las condiciones establecidas en el párrafo e) del apartado 2 del artículo 4 del presente Real Decreto**

La autorización expedida por la autoridad competente a efectos de transporte de huevos de una explotación sospechosa sujeta a lo dispuesto en el párrafo e) del apartado 2 del artículo 4 hacia un establecimiento autorizado para la fabricación y tratamiento de ovoproductos conforme a lo dispuesto en el apartado 1 del artículo

lo 6 de la Directiva 89/437/CEE, denominado en lo sucesivo «establecimiento designado», deberá ajustarse a los siguientes requisitos:

1. Para que puedan extraerse huevos de la explotación sospechosa, éstos deberán:

a) Ajustarse a lo dispuesto en el capítulo IV del anexo de la Directiva 89/437/CEE.

b) Ser directamente enviados de la explotación sospechosa al establecimiento designado; el veterinario oficial de la explotación sospechosa deberá precintar cada envío previamente a su salida, quedando éstos precintados mientras dure el transporte hasta el establecimiento designado.

2. El veterinario oficial de la explotación sospechosa informará a la autoridad competente del establecimiento designado de su intención de enviarle los huevos.

3. La autoridad competente responsable del establecimiento designado se cerciorará de que:

a) Los huevos a que hace referencia el párrafo b) del apartado 1 permanezcan alejados de los demás huevos desde su llegada hasta su tratamiento.

b) Las cáscaras de los mismos consideradas como material de alto riesgo con arreglo a lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 2 de la Directiva 90/667/CEE sean tratadas conforme a lo dispuesto en el capítulo II de la misma Directiva.

c) El material de embalaje, los vehículos utilizados para el transporte de los huevos a que hace referencia el párrafo b) del apartado 1, así como todos los lugares que hayan entrado en contacto con los huevos, se limpien y desinfecten de tal forma que quede eliminado todo virus de la influenza aviar.

d) El veterinario oficial de la explotación sospechosa sea informado de cualquier expedición de huevos tratados.

## ANEXO II

### Procedimiento de limpieza y desinfección de una explotación infectada

#### 1. Limpieza previa y desinfección.

a) Una vez retiradas las canales de las aves para su eliminación, las partes de los locales en donde se encontraban dichas aves, así como cualquier parte del edificio, corral, etc., contaminado durante el sacrificio o la inspección «postmortem» deberán rociarse con desinfectante autorizado conforme a lo dispuesto en el artículo 10 del presente Real Decreto.

b) Todo tejido de ave y huevos que pudiera haber contaminado edificios, corrales, utensilios, etc., deberá recogerse con cuidado a fin de que se eliminen junto con las canales.

c) El desinfectante utilizado deberá permanecer sobre la superficie tratada durante al menos veinticuatro horas.

#### 2. Limpieza final y desinfección.

a) Se deberá eliminar la grasa de cualquier superficie con un producto desengrasante así como las manchas que se lavarán posteriormente con agua.

b) Tras el lavado con agua, que se menciona en el párrafo a), se rociarán nuevamente las superficies con el desinfectante.

c) Una vez transcurridos siete días, los locales deberán tratarse con un producto desengrasante, enjugarse

con agua fría, rociarse con desinfectante y enjugarse de nuevo con agua.

d) El estiércol o pajas utilizadas deberán tratarse con uno de los siguientes métodos para eliminar el virus:

1.º Se incinerarán o se tratarán por vapor a una temperatura de 70°C.

2.º Se enterrarán a una profundidad que impida el acceso a parásitos y aves salvajes.

3.º Se amontonarán y humidificarán (si fuera necesario para facilitar la fermentación), se cubrirán para mantener el calor de forma que se alcance una temperatura de 20°C y se mantendrán cubiertos durante cuarenta y dos días de modo que se evite el acceso de parásitos y aves salvajes.

## ANEXO III

### Métodos de diagnóstico para la confirmación y diagnóstico diferencial de la influenza aviar

Los métodos de aislamiento y de caracterización de los virus de la influenza aviar expuestos a continuación han de considerarse como directrices y constituyen los requisitos mínimos que deben aplicarse en el diagnóstico de dicha enfermedad.

A efectos de los métodos de diagnóstico para la confirmación y el diagnóstico diferencial de la influenza aviar, se empleará la siguiente definición:

Por «influenza aviar» se entiende una infección de las aves de corral producida por cualquier virus de la influenza aviar A cuyo índice de patogenicidad intravenosa sea superior a 1,2 en pollitos de seis semanas de edad, o cualquier infección provocada por el virus del subtipo H5 o H7 de la influenza A cuya secuenciación de nucleótidos haya demostrado la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la hemaglutinina.

## Capítulo I

### Toma de muestras y tratamiento de las mismas

#### 1. Muestras.

Hisopos de cloaca (o materias fecales) e hisopos traqueales de aves enfermas; materias fecales o contenido intestinal, tejido cerebral, tráquea, pulmones, hígado, bazo y otros órganos manifiestamente afectados procedentes de aves recién fallecidas.

#### 2. Tratamiento de las muestras.

Aunque los órganos y los tejidos mencionados en el apartado 1 pueden mezclarse, las materias fecales deberán tratarse por separado. Se sumergirán completamente los hisopos en una cantidad suficiente de medio con antibióticos. A su vez, las muestras de materias fecales y de órganos deberán homogeneizarse (en un mezclador cerrado o utilizando un mortero y arena esterilizada) en un medio con antibióticos para convertirlas en suspensiones en ese medio al 10-20 por 100 p/v. Posteriormente, esas suspensiones se dejarán a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente (o durante más tiempo a una temperatura de 4°C) y se clarificarán por centrifugación (por ejemplo, de 800 a 1.000 g. durante diez minutos).

### 3. Medio con antibióticos.

Diferentes laboratorios han utilizado distintos medios con antibióticos, obteniendo buenos resultados. En cada país, los laboratorios nacionales podrán asesorar al respecto. Para las muestras de materias fecales es necesaria una fuerte concentración de antibióticos; una mezcla típica es la siguiente: 10.000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina, 0,25 mg/ml de gentamicina y 5.000 unidades/ml de micostatina en una solución salina amortiguadora de fosfato. Estos niveles pueden reducirse hasta cinco veces cuando se trabaje con tejidos e hisopos traqueales. Para evitar el crecimiento de *Chlamydia*, pueden añadirse 50 mg/ml de oxitetraciclina. Al elaborar el medio, es imprescindible comprobar el pH después de añadir los antibióticos y corregirlo hasta que fluctúe entre 7,0 y 7,4.

## Capítulo II

### Aislamiento del virus

#### *Aislamiento de virus en huevos embrionados de aves de corral*

Deberán inocularse dosis de 0,1 a 0,2 ml del líquido sobrenadante clarificado dentro de la cavidad alantoidea de al menos cuatro huevos embrionados que hayan sido incubados de ocho a diez días. Es preferible que los huevos procedan de una manada exenta de patógenos específicos, aunque, si ello no fuera posible, podrán utilizarse huevos de una manada exenta de anticuerpos del virus de la influenza aviar. Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37°C y se examinarán al trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos serán refrigerados a 4°C a medida que se vayan comprobando. Los demás lo serán a la misma temperatura seis días después de la inoculación. Los fluidos alantoideos amnióticos se someterán además a la prueba de hemaglutinación. Si ésta resultase negativa, deberá repetirse este procedimiento utilizando fluido alantoideo o amniótico no diluido, como inóculo.

Cuando la hemaglutinación sea positiva, deberá descartarse la posible presencia de bacterias mediante la realización de un cultivo. Si se confirma la presencia de bacterias, podrán filtrarse los fluidos con un filtro de membrana de 450 nm, añadirse más antibióticos e inocularse en huevos embrionados como ya se explicó anteriormente.

## Capítulo III

### Diagnóstico diferencial

#### 1. Diferenciación preliminar.

Teniendo en cuenta que es fundamental que se adopten medidas para limitar la propagación del virus lo antes posible, cada laboratorio regional deberá estar en condiciones de detectar cualquier virus hemaglutinante aislado, tales como los del subtipo H5 o H7 de la influenza, además de los de la enfermedad de Newcastle. Los fluidos hemaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de la hemaglutinación descritas en los capítulos V y VI. Una inhibición positiva, es decir de 2<sup>4</sup> o más, con antisuero policlonal específico para los subtipos H5 y H7 de la influenza A (con un título de al menos 2<sup>9</sup>), se considerará una identificación preliminar suficiente para imponer medidas provisionales de control.

#### 2. Confirmación de la identificación.

Dado que hay 13 subtipos de hemaglutinina y nueve subtipos de neuraminidasa del virus de la influenza y que en cada uno de ellos se presentan variaciones, no es viable ni rentable que cada laboratorio nacional tenga antisueros que posibiliten una caracterización antigénica completa del virus de la influenza. No obstante, cada laboratorio nacional deberá:

a) Confirmar que el microorganismo es un virus de la influenza A utilizando una prueba de inmunodifusión doble para detectar el antígeno de grupo, efectuada de acuerdo con el capítulo IX (si así lo prefieren, los laboratorios nacionales podrán emplear técnicas de inmunofluorescencia o ELISA para la detección de los antígenos de grupo).

b) Determinar si el virus aislado es o no del subtipo H5 o H7.

c) Realizar pruebas del índice de patogenicidad intravenosa en pollos de seis semanas de edad, efectuadas de acuerdo con el capítulo VII del presente anexo. Un índice de patogenicidad intravenosa superior a 1,2 es la señal de que hay virus y de que es necesario aplicar a fondo las medidas de control (sería útil que los laboratorios nacionales realizaran también pruebas de determinación de la capacidad del virus para producir placas en cultivos de células, efectuadas de acuerdo con el capítulo VIII).

Los laboratorios nacionales deberán enviar inmediatamente todo el material de la influenza aviar y de los subtipos H5 o H7 al laboratorio comunitario de referencia para su caracterización total.

#### 3. Tipificación y caracterización adicional del material.

Los laboratorios nacionales enviarán al laboratorio comunitario de referencia todos los virus hemaglutinantes y éste, en consonancia con las competencias y funciones que le han sido asignadas someterá esos virus a estudios antigénicos y genéticos adicionales para llegar a un mejor conocimiento de la epizootiología de la enfermedad o enfermedades en la Comunidad.

Además de esos cometidos, el laboratorio comunitario de referencia llevará a cabo una tipificación antigénica completa de todos los virus de la influenza que haya recibido. En cuanto a los virus H5 o H7 cuyos índices de patogenicidad intravenosa no sean superiores a 1,2 deberá realizarse también la secuenciación de nucleótidos del gen de hemaglutinina para determinar si hay abundancia o no de aminoácidos básicos en el punto de corte de la proteína de hemaglutinina. Los virus con aminoácidos básicos en el punto de corte, aunque presenten índices de patogenicidad poco elevados, requerirán que se apliquen, de manera adecuada, las medidas para luchar contra la influenza aviar.

## Capítulo IV

### Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos del virus de la influenza aviar

1. Tratándose de programas de erradicación en los que el subtipo H del virus ya se conoce, o cuando se utiliza al virus homólogo como antígeno, el control serológico para poner de manifiesto la infección puede llevarse a cabo mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación realizadas según el método descrito en los capítulos V y VI.

Si el subtipo de hemaglutinina no se conoce, la prueba de que la infección es producida por virus de la influenza



A podrá obtenerse detectando anticuerpos dirigidos a los antígenos específicos del grupo.

Con ese fin podrá emplearse una prueba de inmunodifusión doble (tal como se describe en el capítulo IX) o una prueba ELISA (ésta presenta el inconveniente de la especificidad del hospedador de la prueba ya que depende de la detección de las inmunoglobulinas del hospedador). Las aves acuáticas raras veces dan resultados positivos al practicarse pruebas de inmunodifusión doble y, a menos que se conozca el subtipo, es probable que tales aves sólo puedan examinarse para comprobar la presencia de anticuerpos en los subtipos H5 y H7.

## 2. a) Muestras.

Deberán tomarse muestras de sangre de todas las aves cuando la manada esté compuesta de menos de 20 animales y muestras de 20 aves cuando la manada sea mayor (de este modo, la probabilidad de detectar al menos un suero positivo será del 99 por 100 si el 25 por 100 o más de la manada es positivo, independientemente del tamaño de ésta). Para la prueba, deberá dejarse que la sangre se coagule y se extraerá el suero.

## b) Detección de los anticuerpos.

Convendría investigar la capacidad de las muestras individuales de suero para inhibir el antígeno hemaglutinante del virus de la influenza aviar en pruebas estándar de inhibición de la hemaglutinación efectuadas de acuerdo con el capítulo VI.

Dado que las opiniones difieren en cuanto a la utilización de 4 u 8 unidades de hemaglutinina en la prueba de inhibición de la hemaglutinación, y como al parecer ambas dosis son válidas, la elección debería dejarse al arbitrio de los laboratorios nacionales.

Téngase en cuenta, sin embargo, que del antígeno utilizado dependerá el nivel en el que un suero sea considerado positivo: con 4 unidades de hemaglutinina un suero se considerará positivo cuando presente un título superior o igual a  $2^4$ , mientras que con 8 unidades el título deberá ser igual o superior a  $2^3$ .

## Capítulo V

### Prueba de hemaglutinación (HA)

#### Reactivos.

1. Solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (SSIAF) (0,05M) de pH 7,0 a 7,4.
2. Hematíes extraídos de un mínimo de 3 gallinas exentas de patógenos específicos (a falta de éstos, podrá utilizarse sangre de aves que hayan estado bajo control regular y que se hayan reconocido como exentas de anticuerpos del virus de la influenza aviar), reunidos y mezclados a partes iguales con solución de Alsever. Antes de utilizarlos, los hematíes deberán lavarse tres veces en la solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (SSIAF). Para la otra prueba se recomienda una suspensión en PBS al 1 por 100 (valor de hematocrito).
3. El laboratorio comunitario de referencia suministrará virus H5 y H7 de bajo poder patógeno o los recomendará para su utilización como antígenos estándar.

#### Método.

1. Distribuir 0,025 ml de SSIAF en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación (utilizar pocillos con fondo en V).

2. Introducir 0,025 ml de suspensión de virus (es decir, fluido alantoideo) en el primer pocillo.

3. Utilícese una micropipeta para hacer diluciones del virus por desdoblamiento (de 1:2 a 1: 4096) de un pocillo a otro.

4. Añadir otros 0,025 de PBS en cada pocillo.

5. Añadir 0,025 ml de una suspensión al 1 por 100 de hematíes a cada pocillo.

6. Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C.

7. Examinar las placas después de treinta o cuarenta minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de un movimiento de los hematíes en forma de lágrima. Los pocillos en los que no se haya producido la hemaglutinación deberán presentar un movimiento similar al de los pocillos de control que no contengan virus.

8. El título de hemaglutinación será la mayor dilución que produzca la aglutinación de los hematíes. Puede considerarse que tal dilución contiene una unidad de hemaglutinación. Otro método más preciso para determinar el título de hemaglutinación consiste en realizar pruebas de hemaglutinación con virus de una gama completa de diluciones iniciales por ejemplo, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, etc. Este método se recomienda para preparar con gran precisión antígenos para las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (capítulo VI).

## Capítulo VI

### Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)

#### Reactivos.

1. Solución amortiguadora de fosfato (SSIAF).
2. Fluido alantoideo que contenga el virus, diluido con SSIAF hasta que contenga 4 u 8 unidades de hemaglutinación por cada 0,025 ml.
3. Suspensión de hematíes de pollo al 1 por 100.
4. Suero de pollo de control negativo.
5. Suero de control positivo.

#### Método.

1. Distribuir 0,025 ml de SSIAF en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (utilizar pocillos con fondo en V).

2. Introducir 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.

3. Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.

4. Añadir 0,025 ml de fluido alantoideo diluido que contenga 4 u 8 unidades de hemaglutinación.

5. Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C durante al menos sesenta minutos o dejarla a temperatura ambiente durante treinta minutos como mínimo.

6. Añadir 0,025 ml de suspensión de hematíes al 1 por 100 a todos los pocillos.

7. Homogeneizar golpeando ligeramente las placas y refrigerarlas a 4°C.

8. Examinar las placas después de treinta o cuarenta minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrima similar al de los pocillos de control que contenga hematíes (0,025 ml) y SSIAF (0,05 ml) solamente.

9. El título de inhibición de la hemaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa de 4 u 8 unidades de virus (en todas las pruebas deberá incluirse una titulación de hemaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemaglutinación necesarias).

10. La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de  $2^3$  para 4 unidades de hemaglutinación o de  $2^2$  para 8 unidades de hemaglutinación con el suero de control negativo y de un título que esté entre el doble y la mitad (un orden de dilución) del título conocido del suero de control positivo.

## Capítulo VII

### Índice de patogenicidad intravenosa (IVPI)

1. Diluir a  $10^{-1}$  fluido alantoideo infeccioso del pase más bajo posible, preferentemente del aislamiento inicial y sin selección alguna, en una solución salina isotónica esterilizada.

2. Inyectar por vía intravenosa en cada uno de los diez pollitos de seis semanas de edad (deberán utilizarse aves libres de patógenos específicos) 0,1 ml de virus diluido.

3. Examinar las aves cada veinticuatro horas durante diez días.

4. Puntuar todas las aves en cada examen: 0 = normal, 1 = enferma, 2 = gravemente enferma y 3 = muerta.

5. Anotar los resultados y calcular el índice del siguiente modo:

Síntomas clínicos	Días después de la inoculación										Total puntuación
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal ....	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 0 = 0$
Enferma ..	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Gravemente enferma (*) ...	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	$6 \times 2 = 12$
Muerta ....	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
Total = 246											

Índice = puntuación media por ave y por observación:  $\frac{246}{100} = 2,46$

(\*) Se trata de un diagnóstico subjetivo que en general se aplicará a las aves que presenten más de uno de los síntomas siguientes: Problemas respiratorios, depresión, diarrea, cianosis en la piel no recubierta o en las barbillas, edema en la cara o en la cabeza o signos nerviosos.

## Capítulo VIII

### Evaluación de la capacidad de formación de placas

1. Normalmente, lo más conveniente es utilizar una serie de diluciones del virus a fin de obtener un número adecuado de placas en el cultivo. Bastará con diluciones decimales hasta llegar a una concentración de  $10^{-7}$  en SSIAF.

2. Preparar capas monocelulares confluentes de células de embrión de pollito o una línea celular apropiada (por ejemplo, la línea de riñón de bovino de Madin-Darby) en placas de Petri de 5 centímetros de diámetro.

3. Introducir 0,2 ml de cada dilución de virus en dos placas de Petri y esperar treinta minutos para que el virus se absorba.

4. Tras lavar tres veces con SSIAF las células infectadas, se cubrirán con un medio apropiado que contenga agar al 1 por 100 p/v (también puede añadirse 0,01 mg/ml de tripsina). Es importante no añadir suero al medio de recubrimiento.

5. Tras setenta y dos horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , las placas habrán alcanzado un tamaño adecuado. Para observarlas, conviene retirar la capa de agar y teñir la capa monocelular con violeta cristal (0,5 por 100 p/v) en etanol al 25 por 100 (v/v).

6. Todos los virus incubados con tripsina en el medio producirán placas claras. Por el contrario, a falta de tripsina, sólo producirán placas los virus que resulten virulentos para los pollitos.

## Capítulo IX

### Inmunodifusión doble

El método preferido para determinar la presencia del virus de la influenza A consiste en demostrar la existencia de antígenos de la nucleocápsida o de la matriz, que se hallan presentes en todos los virus de la influenza A. Tal demostración se realiza generalmente mediante pruebas de inmunodifusión doble, para las que se necesitan preparaciones de virus concentrados o extractos de membranas corioalantoideas infectadas.

Una preparación adecuada de virus concentrados puede conseguirse sencillamente centrifugando a alta velocidad fluido alantoideo infeccioso y disgregando los virus con detergente de laurilsarcosinato sódico para liberar los antígenos internos de la nucleocápsida y de la matriz. También puede recurrirse a la precipitación ácida añadiendo CIH 1N al fluido alantoideo infeccioso hasta obtener un pH final comprendido entre 3,5 y 4,0; se enfría luego durante al menos una hora a  $0^{\circ}\text{C}$  y se centrifuga a baja velocidad (1.000 g.) durante diez minutos.

Se puede retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado que contiene los virus en un volumen mínimo de solución amortiguadora de glicinasarcosilo (laurilsarcosinato sódico al 1 por 100 ajustado a pH 9,0 con glicina 0,5 M). Esta preparación contiene antígenos de la nucleocápsida y de la matriz.

En 1970, Beard describió la preparación de un producto enriquecido en antígenos de nucleocápsida a partir de membranas corioalantoideas procedentes de huevos infectados. Este método comprende los siguientes pasos: Retirar las membranas corioalantoideas de huevos infectados que den positivo a la prueba de hemaglutinina, triturar u homogeneizar las membranas, congelar y descongelar tres veces y centrifugar a continuación a 1.000 g. durante diez minutos. Se retira el precipitado y se trata el sobrenadante con formol al 0,1 por 100 para utilizarlo como antígeno.

Cualquiera de estos dos antígenos puede utilizarse en las pruebas de inmunodifusión doble empleando geles de agarosa o agar al 1 por 100 que contengan un 8,0 por 100 de cloruro sódico en una solución amortiguadora de fosfato 0,1 M de pH 7,2. La presencia del virus de la influenza A queda confirmada cuando las líneas de precipitación formadas por el antígeno problema y el antígeno positivo conocido frente al antisuero positivo conocido se unen para dar una línea de identidad.



## ANEXO IV

**Laboratorio nacional de referencia para la influenza aviar**

Laboratorio Nacional de Sanidad y Producción Animal de Barcelona, zona franca circunvalación, tramo 6, esquina calle 3, Barcelona.

## ANEXO V

**Laboratorio comunitario de referencia para la influenza aviar**

Nombre del laboratorio: Central Veterinary Laboratory, New, Haw, Weybridge, Surrey KT 15 3NB, Reino Unido.

Las competencias y funciones del laboratorio comunitario de referencia para la influenza aviar son las siguientes:

1. Coordinar, previa consulta a la Comisión, los métodos de diagnóstico de la influenza aviar en los Estados miembros, especialmente, mediante:

a) La especificación, posesión y entrega de cepas del virus de la influenza aviar para someterlas a las pruebas serológicas y preparar el antisuero.

b) La entrega de los sueros de referencia y de otros reactivos de referencia a los laboratorios de referencia nacionales para armonizar las pruebas y los reactivos empleados en cada Estado miembro.

c) La creación y conservación de una colección de cepas y de materia aislada del virus de la influenza aviar.

d) La organización periódica de pruebas comparativas comunitarias de los procedimientos de diagnóstico.

e) La recogida y selección de datos y todo tipo de información sobre los métodos de diagnóstico utilizados y los resultados de las pruebas efectuadas en la Comunidad.

f) La caracterización de la materia aislada del virus de la influenza aviar mediante los métodos más avanzados para lograr una mejor comprensión de la epizootiología de la influenza aviar.

g) El seguimiento de la evolución de la situación en todo el mundo del control, epizootología y prevención de la influenza aviar.

h) La realización de una serie de exámenes técnicos sobre el virus de la influenza aviar y otros virus relacionados con éste para poder hacer un diagnóstico diferencial rápido.

i) El conocimiento a fondo de la preparación y utilización de los productos de medicina veterinaria inmunológica empleados para la erradicación y control de la influenza aviar.

2. Contribuir activamente a la identificación de los focos de influenza aviar en los estados miembros, estudiando la materia aislada del virus enviada para confirmar el diagnóstico, proceder a su caracterización y a los estudios epizootológicos. Concretamente, el laboratorio debería ser capaz de analizar la secuencia de los nucleótidos para poder así determinar la secuencia de los ácidos aminados extraída en el lugar del corte de la molécula de hemaglutinina de los virus gripales de los subtipos H5 o H7.

3. Facilitar la formación o readaptación profesional de los expertos en diagnósticos de laboratorio para amortizar las técnicas de diagnóstico en toda la Comunidad.

## ANEXO VI

**Criterios mínimos aplicables a los planes de intervención**

Los planes de intervención deberán establecer por lo menos:

1) La creación, a nivel nacional, de una célula de crisis destinada a coordinar todas las medidas de urgencia con el Estado miembro afectado.

2) Una lista de los centros locales de urgencia dotados del equipo adecuado para coordinar las medidas de control a escala local.

3) Informaciones detalladas sobre el personal encargado de las medidas de urgencia, sus cualificaciones y responsabilidades.

4) La posibilidad, para cualquier centro local de urgencia, de establecer contacto con las personas/organizaciones directas o indirectamente afectadas por una infección.

5) La disponibilidad de los equipos y materiales necesarios para llevar a cabo de forma apropiada las medidas de urgencia.

6) Las instrucciones precisas relativas a las acciones que se deban adoptar cuando se sospechen y confirmen casos de infección o de contaminación, incluidos los medios de destrucción de los canales.

7) Programas de formación para actualizar y desarrollar los conocimientos relativos a los procedimientos sobre el terreno y a los procedimientos administrativos.

8) Para los laboratorios de diagnóstico, un servicio de examen *post mortem*, la capacidad necesaria para los exámenes serológicos, histológicos, etc, y la actualización de las técnicas de diagnóstico rápido (a estos efectos, procede establecer disposiciones relativas al transporte rápido de muestras).

9) Precisiones relativas a la cantidad de vacunas contra la influenza aviar que se considera necesaria en caso de reinstauración de la vacunación de urgencia.

10) Disposiciones reglamentarias para la aplicación de los planes de intervención.