



## LEGISLACIÓN CONSOLIDADA

---

Real Decreto 1988/1993, de 12 de noviembre, por el que se establecen medidas para la lucha contra la enfermedad de Newcastle.

---

Ministerio de la Presidencia  
«BOE» núm. 288, de 02 de diciembre de 1993  
Referencia: BOE-A-1993-28714

---

### ÍNDICE

<i>Preámbulo</i> . . . . .	3
<i>Artículos</i> . . . . .	3
Artículo 1.. . . . .	3
Artículo 2.. . . . .	3
Artículo 3.. . . . .	4
Artículo 4.. . . . .	4
Artículo 5.. . . . .	5
Artículo 6.. . . . .	6
Artículo 7.. . . . .	6
Artículo 8.. . . . .	6
Artículo 9.. . . . .	7
Artículo 10.. . . . .	8
Artículo 11.. . . . .	9
Artículo 12.. . . . .	9
Artículo 13. Laboratorio de Referencia de la Unión Europea. . . . .	9
Artículo 14.. . . . .	10
Artículo 15.. . . . .	10
Artículo 16.. . . . .	10

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO  
LEGISLACIÓN CONSOLIDADA

---

Artículo 17. . . . .	11
Artículo 18. . . . .	12
Artículo 19. Medidas de información y control. . . . .	12
Artículo 20. . . . .	12
Artículo 21. Infracciones y sanciones. . . . .	12
<i>Disposiciones adicionales</i> . . . . .	12
Disposición adicional primera. . . . .	12
Disposición adicional segunda. . . . .	13
<i>Disposiciones finales</i> . . . . .	13
Disposición final primera. . . . .	13
Disposición final segunda. . . . .	13
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 . . . . .	13
ANEXO II. Procedimiento de limpieza y desinfección de una explotación infectada . . . . .	14
ANEXO III. Procedimiento para la confirmación y diagnóstico diferencial de la enfermedad de Newcastle. . . . .	14
ANEXO IV. Laboratorio nacional de referencia para la enfermedad de Newcastle . . . . .	19

TEXTO CONSOLIDADO  
Última modificación: 11 de marzo de 2023

Norma derogada, con efectos de 12 de marzo de 2023, por la disposición derogatoria única.b) del Real Decreto 148/2023, de 28 de febrero. [Ref. BOE-A-2023-6374](#)

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad de las aves de declaración obligatoria en España, tal y como indica el Real Decreto 1317/1992, de 30 de octubre, por el que se establece las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.

La aparición de la enfermedad de Newcastle en un territorio o la vacunación contra la misma, ocasiona restricciones de movimientos para las aves o productos que puedan estar contaminados por el virus de la enfermedad, lo que dificulta su libre comercialización entre los distintos países, además de las pérdidas económicas que provoca.

Ello se debe a la gravedad de esta enfermedad y a su alto carácter difusivo, lo que se ha traducido en la práctica de la vacunación como medida preventiva en algunas zonas del territorio nacional, siendo conveniente regular el uso de las distintas vacunas para que no exista riesgo de transmisión de la enfermedad ni barreras sanitarias para la plena integración de España en la Comunidad Económica Europea.

Asimismo, la Directiva 92/66/CEE del Consejo, de 14 de julio, establece las medidas comunitarias para la lucha contra la enfermedad de Newcastle y es necesario trasponer la misma a la legislación española para armonizar las pautas de actuación en caso de que aparezca un brote de esta enfermedad en el país y con el fin de erradicarlo eficazmente.

El presente Real Decreto se dicta al amparo de la competencia que el artículo 149.1.16 de la Constitución atribuye al Estado en materia de bases y coordinación general de la sanidad y conforme a la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación, y de Sanidad y Consumo, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión de fecha de 12 de noviembre de 1993,

DISPONGO:

**Artículo 1.**

Sin perjuicio de las disposiciones que regulan el comercio intracomunitario, el presente Real Decreto define las medidas nacionales aplicables en caso de aparición de la enfermedad de Newcastle:

- a) En las explotaciones de aves de corral.
- b) En lo que se refiere a las palomas mensajeras, así como a las demás aves que están en cautividad.

Esta norma no será de aplicación en caso de que se detecte la enfermedad de Newcastle en otras aves silvestres que viven en libertad.

**Artículo 2.**

A efectos del presente Real Decreto, se aplicarán, en su caso, las definiciones del artículo 2 del Real Decreto 1317/1992, de 30 de octubre, por el que se establece las condiciones de sanidad animal aplicables a 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: toda ave de corral en la que un examen efectuado por un laboratorio autorizado haya confirmado oficialmente la presencia de la enfermedad de

Newcastle, o en el caso de un segundo brote, o de brotes sucesivos, toda ave de corral en la que se hayan encontrado síntomas clínicos o lesiones «post mortem» propios de la enfermedad de Newcastle.

b) Ave de corral sospechosa de estar infectada: toda ave de corral con síntomas clínicos o lesiones «post mortem» tales que se pueda sospechar justificadamente la presencia de la enfermedad de Newcastle.

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 enfermedad de Newcastle.

d) Aguas grasas: los desperdicios procedentes de cocinas, restaurantes o, en su caso, industrias cárnicas.

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

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

g) Paloma mensajera: toda paloma que se transporte o esté destinada a su transporte del palomar para ser liberada de forma que pueda volver volando a su palomar o a cualquier otro destino.

h) Palomar: toda instalación utilizada para guardar o criar palomas mensajeras.

### **Artículo 3.**

Toda sospecha de enfermedad Newcastle deberá notificarse obligatoria e inmediatamente al órgano competente de la Comunidad Autónoma.

### **Artículo 4.**

1. Cuando en una explotación haya aves de corral sospechosas de estar infectadas o contaminadas por la enfermedad de Newcastle, el veterinario oficial realizará inmediatamente una investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de esta enfermedad; en particular, efectuará o hará que se efectúen las tomas de muestras adecuadas para los exámenes de laboratorio.

2. En cuanto se le notifique la sospecha de infección o contaminación, el órgano competente de la Comunidad Autónoma pondrá la explotación bajo vigilancia oficial y ordenará:

a) Que se realice 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) Que se recluyan todas las aves de corral de la explotación en sus locales habituales o en cualquier otro lugar en el que queden aisladas, sin ningún contacto con otras aves.

c) Que se prohíba la salida de aves de corral que se encuentren en la explotación, así como la entrada de otras aves en aquélla.

d) Que se subordine 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 cadáveres de aves de corral, piensos, material, residuos, deyecciones, yacijas, estiércol o cualquier otro elemento capaz de transmitir la enfermedad Newcastle.

e) Que se prohíba la salida de la explotación de huevos, salvo aquéllos enviados directamente a un establecimiento autorizado para la fabricación o el tratamiento de ovoproductos y que sean transportados de conformidad con una autorización expedida por la autoridad competente. Esta autorización deberá cumplir los requisitos establecidos en el anexo I.

f) Que se apliquen los 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 2, el propietario o avicultor de toda explotación en la que se sospeche la presencia de la enfermedad adoptará todas las medidas razonables que garanticen el cumplimiento de las disposiciones contempladas en dicho apartado, con exclusión del párrafo g).

4. El órgano competente de la Comunidad Autónoma 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 existencia de la enfermedad de Newcastle.

#### **Artículo 5.**

1. Cuando se confirme oficialmente la presencia en una explotación de la enfermedad de Newcastle, el órgano competente de la Comunidad Autónoma declarará la enfermedad y lo comunicará al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, a efectos de sus competencias de coordinación.

2. Dicho órgano, ordenará, además de las medidas mencionadas en el apartado 2 del artículo 4:

a) El sacrificio «in situ» y sin demora 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, yacijas 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 enfermedad Newcastle.

c) En lo posible, la búsqueda y destrucción de la carne de las aves de corral procedentes de la explotación 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; en 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) Después de realizar las operaciones de limpieza y desinfección será necesario un período mínimo de veintiún días para volver a introducir aves de corral en la explotación.

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

3. El órgano competente de la Comunidad Autónoma podrá aplicar las medidas previstas en el apartado 2 a otras explotaciones vecinas cuando su ubicación, características o contactos con la explotación en la que se haya confirmado la enfermedad permitan sospechar una posible contaminación.

4. Cuando una cepa de virus de la enfermedad de Newcastle que tenga un ICPI (índice de patogenidad intracerebral) superior a 0,7 e inferior a 1,2 se haya aislado en una manada de aves de corral que no presente ningún síntoma clínico de dicha enfermedad, y cuando el laboratorio comunitario de referencia a que se hace mención en el artículo 13 haya demostrado que dicho virus aislado procede de una vacuna viva atenuada de la enfermedad de Newcastle, la autoridad competente podrá conceder una exención a los requisitos de los párrafos a) a f) del apartado 2, siempre que la explotación de que se trate se someta a vigilancia oficial durante un período de treinta días y deberá exigir, en particular:

a) Que se apliquen las disposiciones de los párrafos a), b), d), e) y f) del apartado 2 del artículo 4.

b) Que ninguna ave de corral salga de la explotación salvo para ser conducida directamente a un matadero designado por la autoridad competente.

El órgano competente de la Comunidad Autónoma responsable de dicho matadero deberá tener conocimiento de la intención de enviarle aves de corral para el sacrificio y, desde el momento de su llegada al matadero, dichas aves de corral deberán recluirse y sacrificarse aparte de las demás aves de corral.

5. La carne fresca procedente de las aves de corral mencionadas en el apartado 3 del presente artículo deberá llevar la marca de inspección veterinaria prevista en el apartado 1 del artículo 5 del Real Decreto 1322/1992, de 30 de octubre, por el que se establece las condiciones de sanidad animal a las que deben ajustarse los intercambios intracomunitarios y las importaciones de carnes frescas de aves de corral procedentes de países terceros.

#### **Artículo 6.**

Cuando las explotaciones estén formadas por dos o más manadas independientes, el órgano competente de la Comunidad Autónoma basándose en los criterios establecidos por la Comisión de la CEE, podrá eximir de los requisitos del apartado 2 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 de una manada a otra.

#### **Artículo 7.**

1. La investigación epidemiológica estudiará los siguientes aspectos:

a) Posible origen de la enfermedad de Newcastle en la explotación o palomar y período de su presencia en los mismos.

b) Localización de las demás explotaciones o palomares en los que se encuentren aves de corral, palomas u otras aves que están en cautividad que hayan podido infectarse o contaminarse a partir del mismo foco.

c) Movimientos de personas, aves de corral, palomas u otras aves que están en cautividad u otros animales, vehículos, huevos, carne, cadáveres y cualquier utensilio o material que haya podido transmitir el virus de la enfermedad de Newcastle a las explotaciones o los palomares afectados o propagarlo a partir de los mismos.

2. Se creará un centro de crisis de ámbito nacional que coordine las medidas para erradicar rápidamente la enfermedad y que realice el estudio epidemiológico de acuerdo con las normas que, en su caso, establezca la normativa comunitaria.

#### **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 la enfermedad de Newcastle, llevar a cabo el censo de las aves de corral, controlar sus movimientos y, en su caso, aplicar las medidas previstas en el apartado 3.

3. Cuando una explotación esté sometida al control oficial de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 y 2, el órgano competente de la Comunidad Autónoma 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 enfermedad de Newcastle. 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, a partir de la iniciación del control oficial.

4. Cuando considere que las condiciones lo permiten, el órgano competente de la Comunidad Autónoma 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.

5. Cuando el veterinario oficial disponga de indicios para sospechar que las palomas mensajeras o cualquier palomar están contaminados por el virus de la enfermedad de Newcastle, tomará todas las medidas apropiadas con el fin de que dicho palomar se someta a medidas restrictivas que incluirán la prohibición de movimientos de las palomas mensajeras fuera del palomar durante veintiún días.

#### **Artículo 9.**

1. Cuando el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle se haya confirmado oficialmente en las aves de corral, el órgano competente de la Comunidad Autónoma delimitará alrededor de la explotación infectada, una zona de protección de un radio mínimo de tres kilómetros, englobada en una zona de vigilancia de un radio mínimo de diez kilómetros. Para la delimitación de estas zonas deberán tenerse en cuenta aquellos factores geográficos, administrativos, ecológicos y epizootiológicos relacionados con la enfermedad de Newcastle, 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; deberá llevarse 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 cadáveres y huevos, así como de los vehículos utilizados para su transporte, en general, se prohibirá el transporte de las aves, exceptuando 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, el órgano competente de la Comunidad Autónoma podrá autorizar el transporte:

1.º De aves de corral para su sacrificio inmediato, preferentemente a un matadero situado en la zona infectada, o, de no ser ello posible, a uno situado fuera de ésta y designado por la autoridad competente. La carne de dichas aves deberá llevar la marca especial de inspección veterinaria establecida en el apartado 1 del artículo 5 del Real Decreto 1322/1992.

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. No obstante, si esta medida no se puede llevar a cabo, la Comisión podrá autorizar el transporte de los mismos a una explotación situada fuera de la zona de vigilancia. Las explotaciones a las que se hace referencia deberán estar sometidas al control oficial de conformidad con el apartado 2 del artículo 8.

3.º De huevos para incubar en una incubadora designada por la autoridad competente; los huevos y sus envases deberán desinfectarse antes de ser enviados.

Los desplazamientos indicados en este párrafo f) 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 yacijas.

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 veintiún días después de que se hayan efectuado en la explotación infectada las operaciones preliminares de limpieza y desinfección con arreglo a lo dispuesto en el anexo II. 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 el órgano competente de la Comunidad Autónoma, en cuyo caso la carne de estas aves deberá llevar la marca de inspección veterinaria especial establecida en el apartado 1 del artículo 5 del Real Decreto 1322/1992.

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

e) Prohibición de sacar estiércol de aves de corral o sus yacijas 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 medidas contempladas en los párrafos a) y b), 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, Andorra o Portugal, los órganos competentes de las Comunidades Autónomas lo notificarán al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación a efectos de que éste, a través del cauce correspondiente, colabore con dichos Estados en la delimitación de tales zonas.

7. Cuando la investigación epidemiológica contemplada en el artículo 7 confirme que el foco se debe a una infección que no presenta ampliación alguna, la dimensión y la duración de aplicación de las zonas de protección y de vigilancia podrán ser reducidas según disponga la Comisión de la CEE.

#### **Artículo 10.**

El órgano competente de la Comunidad Autónoma adoptará las medidas oportunas para:

a) Establecer las normas que le permitan controlar los desplazamientos de huevos y de aves de corral, palomas mensajeras y de aves que están en cautividad.

b) Recibir la información que le haya sido solicitada al propietario o poseedor de aves de corral, de palomas mensajeras o de aves que están en cautividad, relativa a los datos sobre las entradas y salidas de su explotación de aves de corral y huevos, así como los datos relativos a las competiciones o exposiciones en las que hayan participado las palomas mensajeras.

c) Recibir de cualquier persona que se dedique al transporte o al comercio de aves de corral, huevos, palomas mensajeras y aves que están en cautividad, la información relativa a los desplazamientos de aquéllas que haya transportado o comercializado.

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

e) Que se efectúen las operaciones de limpieza y desinfección según el procedimiento previsto en el anexo II y según las instrucciones del veterinario oficial.

f) 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 enfermedad Newcastle deberán efectuarse con arreglo a las disposiciones del anexo III.

**Artículo 12.**

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

a) Realizar la tipificación completa de las características antigénicas y biológicas del virus de la enfermedad de Newcastle y confirmar los resultados obtenidos por los laboratorios de diagnóstico de las comunidades autónomas.

b) Controlar los reactivos utilizados por los laboratorios de diagnóstico de las comunidades autónomas.

c) Controlar la eficacia, potencia y pureza de las vacunas utilizadas con carácter preventivo en el territorio nacional o almacenadas para una intervención de urgencia.

2. Dicho laboratorio se encargará de la coordinación de las normas y los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Newcastle establecidos, en su caso, en cada laboratorio de diagnóstico de las comunidades autónomas, así como del uso de reactivos y el ensayo de vacunas. Para ello:

a) Podrá proporcionar a dichos laboratorios de las comunidades autónomas 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 enfermedad de Newcastle recogidos de casos confirmados en el territorio nacional.

e) Confirmará los resultados positivos obtenidos en los laboratorios de diagnóstico de las comunidades autónomas.

3. El laboratorio nacional de referencia se mantendrá en contacto con el laboratorio comunitario de referencia.

4. Las autoridades competentes llevarán listas actualizadas de los laboratorios regionales y las comunicarán al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, que las pondrá a disposición de los demás Estados miembros y del público, posibilitando el acceso a dicha información por medios electrónicos.

**Artículo 13.** *Laboratorio de Referencia de la Unión Europea.*

1. El laboratorio de referencia de la Unión Europea para la enfermedad de Newcastle será el que designe la Comisión Europea mediante un acto de ejecución.

2. Las funciones y cometidos del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la enfermedad de Newcastle son las siguientes:

a) Coordinar, en consulta con la Comisión Europea, los métodos empleados en los Estados miembros para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle, especialmente mediante:

1.º El tipado, almacenamiento y suministro de cepas del virus de la enfermedad de Newcastle para la realización de pruebas serológicas y la preparación de antisueros.

2.º El suministro de sueros normalizados y otros reactivos de referencia a los laboratorios nacionales de referencia para armonizar las pruebas y la preparación de antisueros.

3.º La constitución y conservación de una colección de cepas y aislados del virus de la enfermedad de Newcastle.

4.º La organización periódica de pruebas comparativas de los procedimientos de diagnóstico dentro de la Unión Europea.

5.º La recogida y contrastación de datos y de información sobre los métodos de diagnóstico utilizados y los resultados de las pruebas efectuadas en la Unión Europea.

6.º La caracterización de aislados del virus de la enfermedad de Newcastle mediante los métodos disponibles más avanzados, para fomentar una mejor comprensión de la epidemiología de dicha enfermedad.

7.º El seguimiento de la evolución de la situación de la vigilancia, epidemiología y prevención de la enfermedad de Newcastle en todo el mundo.

8.º La compilación de conocimientos y experiencia sobre el virus de la enfermedad de Newcastle y otros virus afines relacionados con éste para poder hacer un diagnóstico diferencial rápido.

9.º Un conocimiento profundo sobre la preparación y utilización de los medicamentos inmunológicos veterinarios empleados para la erradicación y el control de la enfermedad de Newcastle.

b) Contribuir activamente en la identificación de focos de la enfermedad de Newcastle en los Estados miembros, recibiendo aislados víricos para confirmar el diagnóstico, proceder a su caracterización y estudio epidemiológico.

c) Facilitar la formación o puesta al día de expertos en diagnóstico de laboratorio para armonizar las técnicas de diagnóstico en la Unión.

#### **Artículo 14.**

La vacunación contra la enfermedad de Newcastle sólo podrá realizarse con vacunas inscritas en el Registro de Especialidades Farmacéuticas como medicamentos veterinarios en el marco de las medidas profilácticas o como complemento de las medidas de lucha contra dicha enfermedad en el momento de su aparición.

#### **Artículo 15.**

1. Los órganos competentes de las Comunidades Autónomas en cuyo territorio se practique la vacunación preventiva, voluntaria u obligatoria contra la enfermedad de Newcastle informarán de los datos siguientes al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para que éste, a través del cauce correspondiente, los transmita a la Comisión de la CEE:

a) Las características y composición de cada tipo de vacuna utilizado.

b) Las modalidades de supervisión de la distribución, del almacenamiento y de la utilización de las vacunas.

c) Las especies y categorías de aves de corral que deban ser vacunadas o que puedan serlo.

d) Las zonas en que pueda o deba efectuarse la vacunación.

e) Los motivos por los cuales se ha efectuado la vacunación.

2. Dichos órganos podrán establecer un programa de vacunación de las palomas mensajeras. En tal caso, deberán comunicarlo al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para que éste, a través del cauce correspondiente, lo transmita a la Comisión de la CEE. Sin perjuicio de dicho programa, los organizadores de concursos y exposiciones tomarán las disposiciones necesarias para que solamente sean inscritas en competiciones o exposiciones las palomas mensajeras que hayan sido vacunadas contra la enfermedad de Newcastle.

#### **Artículo 16.**

1. Cuando se haya comprobado un brote de enfermedad de Newcastle, el órgano competente de la Comunidad Autónoma, con el fin de completar las otras medidas de control previstas en el presente Real Decreto, podrá delimitar un territorio y un período en los que, bajo control oficial, se realizará la vacunación rápida y sistemática –vacunación de urgencia– de las especies designadas de aves de corral. Se informará de ello al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para su notificación a la Comisión, a través del cauce correspondiente.

2. En el caso contemplado en el apartado 1, estará prohibido vacunar o revacunar aves de corral en las explotaciones sometidas a las restricciones a que se refiere el artículo 4.

3. En el caso contemplado en el apartado 1:

- a) Deberán vacunarse lo antes posible las especies de aves de corral designadas.
- b) Toda ave de corral de las especies designadas nacida o introducida en una explotación de la zona de vacunación deberá ser o estar vacunada.
- c) Durante la vacunación contemplada en el apartado 1, toda ave de corral de las especies designadas deberá permanecer en la zona de vacunación, excepto cuando se trate de:

1.º Pollitos de un día de edad destinados a una explotación de la zona de vacunación donde serán vacunados.

2.º Aves trasladadas directamente a un matadero de la zona de vacunación para su sacrificio inmediato. Cuando el matadero esté situado fuera de la zona de vacunación, únicamente se permitirán movimientos de aves de corral después de que el veterinario oficial haya efectuado una inspección sanitaria de la explotación.

d) Al término de las operaciones de vacunación previstas en el párrafo a) podrá autorizarse la salida de la zona de vacunación de:

1.º Pollitos de un día destinados a la producción cárnica de una explotación, donde deberán ser vacunados; la explotación deberá mantenerse bajo vigilancia hasta que las aves que se hayan trasladado allí hayan sido sacrificadas.

2.º Aves de corral vacunadas al menos veintiún días antes, siempre que vayan a ser sacrificadas inmediatamente.

3.º Huevos para incubar procedentes de aves de corral de reproducción vacunadas al menos veintiún días antes, siempre que los huevos y sus envases se hayan desinfectado.

4. Las medidas previstas en los párrafos b) y d) del apartado 3 se aplicarán durante un período de tres meses, renovable por períodos sucesivos de tres meses, al término de las operaciones de vacunación establecidas en el apartado 1.

5. No obstante lo dispuesto en los párrafos a) y b) del apartado 3, el órgano competente de la Comunidad Autónoma podrá decidir que no se sometan a vacunación sistemática determinadas manadas de aves de corral de especial valor científico, siempre y cuando la autoridad competente adopte todas las disposiciones necesarias para proteger su salud y las sometan a controles serológicos periódicos.

#### **Artículo 17.**

1. Cuando se sospeche que hay palomas mensajeras o aves que están en cautividad infectadas por la enfermedad de Newcastle, el veterinario oficial pondrá inmediatamente en práctica los medios de investigación oficiales encaminados a confirmar o descartar la presencia de la enfermedad; en particular, el veterinario oficial efectuará o hará efectuar las tomas de muestras pertinentes con vistas a su examen en laboratorio.

2. Desde la notificación de la sospecha, el órgano competente de la Comunidad Autónoma someterá al palomar o a la explotación a vigilancia oficial y ordenará que ninguna paloma, ave que está en cautividad, ni nada que pueda transmitir la enfermedad de Newcastle, salga del palomar o de la explotación.

3. Las medidas establecidas en los apartados 1 y 2 se levantarán únicamente cuando el veterinario oficial haya descartado la sospecha de enfermedad de Newcastle.

4. Cuando la infección se confirme oficialmente, el órgano competente de la Comunidad Autónoma declarará la enfermedad y lo comunicará al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación a efectos de sus competencias de coordinación, ordenando: la aplicación de las medidas de control y erradicación establecidas en los párrafos a), b), e) y f) del apartado 2 del artículo 5 a las palomas mensajeras o a las aves que están en cautividad y a los palomares o a las explotaciones infectadas por la enfermedad de Newcastle, o al menos:

1.º La prohibición de movimientos de las palomas o de las aves que están en cautividad fuera del palomar o de la explotación durante un período mínimo de sesenta días a partir de la desaparición de síntomas clínicos de la enfermedad de Newcastle.

2.º La destrucción o tratamiento de todo material o desperdicio que pueda estar contaminado. El tratamiento deberá garantizar la destrucción de todos los virus presentes de

la enfermedad de Newcastle y de todos los desperdicios acumulados durante el período de sesenta días mencionados en el párrafo anterior de este apartado.

3.º Una investigación epidemiológica de conformidad con lo establecido en el artículo 7.

5. Los órganos competentes de las comunidades autónomas informarán al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación a efectos de que este transmita a la Comisión, en el marco del Comité Permanente de Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos, información sobre la situación de la enfermedad y de las medidas de control aplicadas. Esta información se proporcionará según normas relativas a la información que se podrán establecer por la Comisión Europea mediante actos de ejecución.

#### **Artículo 18.**

1. Queda prohibido utilizar en la alimentación de las aves de corral las aguas grasas procedentes de medios de transporte internacionales, tales como buques, vehículos terrestres y aeronaves. Estas aguas grasas deberán ser recogidas y destruidas bajo supervisión oficial.

2. La utilización de aguas grasas distintas de las indicadas en el apartado 1 o de desperdicios de aves de corral en la alimentación de las aves de corral únicamente podrá autorizarse tras haberlos sometido a un tratamiento térmico en instalaciones apropiadas que garantice la destrucción del virus de la enfermedad de Newcastle y que elimine el riesgo de transmisión de la enfermedad.

#### **Artículo 19.** *Medidas de información y control.*

1. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación preparará un plan de urgencia, en coordinación con las comunidades autónomas, que especifique las medidas que deberán aplicarse a escala nacional en caso de que se registren brotes de la enfermedad de Newcastle. Este plan se actualizará, según proceda, teniendo en cuenta la evolución de la situación, y tanto el plan como sus posibles actualizaciones, serán sometidos a la Comisión Europea para su aprobación.

Este plan permitirá el acceso, conforme a la normativa vigente, a las instalaciones, equipamiento, personal y cualquier otro material adecuado que sean necesarios para la rápida y eficaz erradicación del brote. Indicará de manera precisa las necesidades de vacuna de que se deba disponer, a nivel nacional, para una vacunación de emergencia.

2. Los criterios que deberán aplicarse para la elaboración de dicho plan serán los establecidos por la Comisión Europea mediante actos de ejecución.

#### **Artículo 20.**

En el supuesto de que expertos de la Comisión de la CEE realicen controles sobre el terreno para verificar el cumplimiento del presente Real Decreto, por parte de los órganos competentes de las Comunidades Autónomas y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en sus respectivos ámbitos de competencia, se les facilitará la asistencia necesaria para el desempeño de sus funciones, a cuyos efectos representantes del citado Departamento podrán acompañar a dichos expertos.

#### **Artículo 21.** *Infracciones y sanciones.*

En caso de incumplimiento de lo dispuesto en este real decreto, será de aplicación el régimen de infracciones y sanciones previsto en la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal; en la Ley 14/1986, de 25 de abril, y, en su caso, en el Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria, sin perjuicio de las responsabilidades civiles, penales o de otro orden a que hubiera lugar.

#### **Disposición adicional primera.**

El presente Real Decreto se dicta al amparo del artículo 149.1.16 de la Constitución, que atribuye al Estado competencia sobre bases y coordinación general de la sanidad, y conforme a la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.

**Disposición adicional segunda.**

En relación con las palomas militares a que se refiere el Real Decreto 2571/1983, de 27 de septiembre, por el que se regula la tenencia y utilización de las mensajeras, será autoridad competente el Ministerio de Defensa.

**Disposición final primera.**

Se faculta a los Ministros de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo para dictar, en el ámbito de sus atribuciones, 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 12 de noviembre de 1993.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de la Presidencia,  
ALFREDO PÉREZ RUBALCABA

**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 artículo 5 del Real Decreto 1348/1992, de 6 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que regula la producción y comercialización de los ovoproductos, 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 del Real Decreto 1348/1992.
  - 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 sean consideradas como material de alto riesgo con arreglo a lo dispuesto en la normativa comunitaria relativa a las normas veterinarias relativas a la eliminación y transformación de desperdicios animales, a su puesta en el mercado y a la protección de los agentes patógenos en los piensos de origen animal o a base de pescado.
  - 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 enfermedad de Newcastle.
  - 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

#### I. 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 «post mortem» 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.

#### II. 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, enjuagarse con agua fría, rociarse con desinfectante y enjuagarse 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 Grad. °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 Grad. °C y se mantendrán cubiertos durante cuarenta y dos días de modo que se evite el acceso de animales dañinos y aves salvajes.

## ANEXO III

### Procedimiento para la confirmación y diagnóstico diferencial de la enfermedad de Newcastle

Los siguientes procedimientos de aislamiento y caracterización de los virus de la enfermedad de Newcastle han de considerarse como directrices y constituyen los requisitos mínimos que deben aplicarse en el diagnóstico de dicha enfermedad.

El virus responsable de la enfermedad de Newcastle es la especie tipo de la familia «Paramyxoviridae». Hasta ahora, existen nueve grupos serológicamente diferenciables de paramixovirus aviarios, que se han denominado PMV-1 a PMV-9. Todos los virus de la enfermedad de Newcastle se sitúan en el grupo PMV-1. A los efectos de los procedimientos de diagnóstico para la confirmación y el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Newcastle, se empleará la siguiente definición:

Por enfermedad de Newcastle se entiende una infección producida por cualquier cepa aviaria del paramixovirus 1, con un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) superior a 0,7 en pollitos de un día de edad.

## CAPÍTULO I

### Toma de muestras y tratamiento de las mismas

#### 1. Muestras.

Escobillados de cloaca (o materias fecales) y escobillados 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 escobillados 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 una mano y 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 Grad. °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, con buenos resultados. El laboratorio enumerado en el anexo IV podrá asesorar al respecto. Para las muestras de materias fecales es necesaria una fuerte concentración de antibióticos; así, 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 y escobillados 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 del virus en huevos embrionados de gallina.

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 de gallina 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 enfermedad de Newcastle. Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37 Grad. °C y se examinarán al trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos serán refrigerados a 4 Grad. °C a medida que se vayan comprobando. Los demás lo serán a la misma temperatura seis días después de la inoculación. Los fluidos alantoideos o amnióticos se someterán además a la prueba de hemaglutinación. Si la prueba de hemaglutinación resultase negativa, deberá repetirse el procedimiento anterior 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.

Todos los virus hemaglutinantes deberán enviarse al laboratorio nacional para su completa identificación y caracterización y para ser objeto de pruebas de patogenicidad. No obstante, como es fundamental que se adopten, lo antes posible, medidas provisionales para limitar la extensión de la enfermedad de Newcastle, los laboratorios regionales deberán ser capaces de detectar el virus de dicha enfermedad. Por ello, los fluidos hemaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de la hemaglutinación descritas en los capítulos 5 y 6. Una inhibición positiva, es decir de 2<sup>4</sup> o más, con antisuero policlonal

específico para el virus de la enfermedad de Newcastle (con un título conocido de al menos 2<sup>9</sup>), se considerará una identificación preliminar suficiente para imponer medidas provisionales para la lucha contra la enfermedad.

## 2. Confirmación.

Un laboratorio nacional deberá efectuar un diagnóstico diferencial completo de todos los agentes hemaglutinantes. La presencia del virus de la enfermedad de Newcastle volverá a confirmarse por inhibición realizando pruebas de inhibición de la hemaglutinación con antisueros de gallina monoespecíficos. Todo el material positivo deberá someterse a la prueba del índice de patogenicidad intracerebral con arreglo al procedimiento descrito en el capítulo VII. Los índices de patogenicidad superiores a 0,7 indicarán que la presencia del virus exige la aplicación de todas las medidas de lucha contra la enfermedad.

Gracias a los últimos progresos realizados en materia de tipificación de los virus de la enfermedad de Newcastle, especialmente las técnicas de anticuerpos monoclonales, ha sido posible agrupar las cepas y microorganismos aislados. Concretamente, se dispone de algunos anticuerpos monoclonales específicos para las cepas utilizadas en las vacunas de la Comunidad Europea. Estos anticuerpos pueden emplearse en pruebas sencillas de inhibición de la hemaglutinación.

Dado que a partir de las aves de corral utilizadas como muestra a menudo pueden aislarse vivas las cepas utilizadas en las vacunas, resulta obvia la ventaja de que los laboratorios nacionales puedan identificarlas con rapidez. El laboratorio comunitario de referencia podrá obtener esos anticuerpos monoclonales y facilitárselos a los laboratorios nacionales para que puedan confirmar el aislamiento de los virus utilizados en las vacunas.

Los laboratorios nacionales deberán enviar todos los agentes hemaglutinantes al laboratorio comunitario de referencia, a través del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

## 3. Tipificación y caracterización adicional de los virus aislados.

Los laboratorios nacionales enviarán al laboratorio comunitario de referencia, a través del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, todos los virus hemaglutinantes y éste, en consonancia con las funciones y cometidos que le han sido asignados, 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.

## CAPÍTULO IV

### **Pruebas rápidas para la detección del virus y los anticuerpos de la enfermedad de Newcastle**

#### **Pruebas rápidas para la detección del virus de la enfermedad de Newcastle en aves vacunadas y la detección de anticuerpos en aves no vacunadas**

##### 1. Detección del virus de la enfermedad de Newcastle.

Se vienen empleando varias pruebas rápidas para detectar directamente los antígenos de la enfermedad de Newcastle en el diagnóstico de infecciones de aves vacunadas; las más extendidas por el momento son la prueba con anticuerpos fluorescentes en secciones longitudinales de la tráquea y la prueba con anticuerpos de la peroxidasa en el encéfalo. No hay motivos para creer que no se pueden aplicar a las infecciones por el virus de la enfermedad de Newcastle otras pruebas de detección directa de antígenos.

Estas pruebas tienen el inconveniente de que no resulta rentable examinar todos los posibles puntos de replicación del virus de la enfermedad de Newcastle en las aves vacunadas. Así, la ausencia de indicios del virus en la tráquea, por ejemplo, no excluye que éste se replique en el intestino. No se recomienda ningún método determinado de detección directa para su uso rutinario, si bien, en determinadas circunstancias, pueden ser de utilidad.

##### 2. Detección de anticuerpos en aves no vacunadas.



La mayoría de los laboratorios que efectúan diagnósticos de la enfermedad de Newcastle conocen la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Las recomendaciones que vienen a continuación se refieren a esta prueba para la medición de anticuerpos del virus. No obstante, la prueba de inmunosorción con enzimas (ELISA) puede dar buenos resultados cuando se usa para detectar los anticuerpos del virus. Se aconseja que, cuando los laboratorios regionales deseen servirse de la prueba ELISA, ésta sea supervisada por el laboratorio nacional contemplado en el anexo IV.

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 99 por 100 si el 25 por 100 o más de la manada es positivo, independientemente del tamaño de ésta). Deberá dejarse que la sangre se coagule y se extraerá el suero para la prueba.

b) Examen de los anticuerpos.

Se probará la capacidad de las muestras individuales de suero para inhibir el antígeno hemaglutinante del virus de la enfermedad de Newcastle en pruebas estándar de inhibición de la hemaglutinación efectuadas de acuerdo con el capítulo VI.

Como las opiniones difieren en cuanto a la utilización de cuatro u ocho unidades de hemaglutinina en la prueba de inhibición de la hemaglutinación, y al parecer ambas dosis son válidas, la elección se deja 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 cuatro unidades de hemaglutinina, un suero se considerará positivo cuando presente un título superior o igual a  $2^4$ ; mientras que con ocho 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 (0,05 M) de pH 7,0 a 7,4.
2. Hematíes extraídos de un mínimo de tres gallinas exentas de patógenos específicos (a falta de éstas, podrá utilizarse sangre de aves que hayan estado bajo control regular y que estén exentas de anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle), 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. Para la prueba se recomienda una suspensión de dicha solución al 1 por 100 (hematíes empaquetados v/v).
3. Se recomienda la utilización como antígeno estándar de la cepa de virus de la enfermedad de Newcastle Ulster 2C.

Procedimiento.

- a) Distribuir 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación (utilizar pocillos con fondo en V).
- b) Introducir 0,025 ml de suspensión de virus (es decir, fluido alantoideo) en el primer pocillo.
- c) Utilizar una micropipeta para hacer diluciones del virus a la mitad (de 1:2 a 1:4096) en toda la placa.
- d) Distribuir otros 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada pocillo.
- e) Añadir 0,025 ml de una suspensión al 1 por 100 de hematíes a cada pocillo.
- f) Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4 Grad. °C.
- g) Leer las placas después de treinta o cuarenta minutos, cuando se hayan sedimentado los controles. La lectura 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.

h) El título de hemaglutinación será la mayor dilución que produzca la aglutinación de los hematíes. Puede considerarse que tal dilución contiene el título de hemaglutinación. Otro método más preciso para determinar el título de hemaglutinación consiste en realizar pruebas de hemaglutinación con virus en una gama de diluciones iniciales muy cercanas entre sí, 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 (véase el capítulo VI).

## CAPÍTULO VI

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

Reactivos (véase el capítulo V).

- a) Solución salina isotónica amortiguadora de fosfato.
- b) Fluido alantoideo que contenga el virus, diluido con solución salina isotónica amortiguadora de fosfato hasta que contenga 4 u 8 unidades de hemaglutinación por cada 0,025 ml.
- c) Suspensión de hematíes de gallina al 1 por 100.
- d) Suero de gallina de control negativo.
- e) Suero de control positivo.

Procedimiento.

- a) Distribuir 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación (utilizar pocillos con fondo en V).
- b) Introducir 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- c) Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
- d) Añadir 0,025 ml de fluido alantoideo diluido que contenga 4 u 8 unidades de hemaglutinación.
- e) Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4 Grad. °C, al menos, durante sesenta minutos o dejarla a temperatura ambiente durante treinta minutos, como mínimo.
- f) Añadir 0,025 ml de suspensión de hematíes al 1 por 100 a todos los pocillos.
- g) Homogeneizar golpeando ligeramente las placas y refrigerarlas a 4 °C.
- h) Leer las placas después de treinta a cuarenta minutos, cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. La lectura 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 contengan hematíes (0,025 ml) y solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0,05 ml) solamente.
- i) 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).
- j) La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de 2<sup>3</sup> para cuatro unidades de hemaglutinación o de 2<sup>2</sup> para ocho unidades de hemaglutinación con el suero de control negativo y de un título de dilución inmediatamente superior o inmediatamente inferior al título conocido del suero de control positivo.

## CAPÍTULO VII

### Índice de patogenicidad intracerebral (IVPI)

1. Diluir a 1:10 fluido alantoideo recién recogido e infeccioso (el título de hemaglutinación deberá ser superior a 2<sup>4</sup>) en un fluido fisiológico estéril (no podrán utilizarse antibióticos).
2. Inyectar en el cerebro de cada uno de 10 pollitos de un día de edad (es decir, veinticuatro horas y cuarenta horas después de salir del huevo) 0,05 ml de virus diluido. Los pollitos deberán haber nacido de huevos procedentes de una manada exenta de patógenos específicos.

3. Examinar las aves cada veinticuatro horas durante ocho días.
4. Puntuar todas las aves de cada examen: 0 = normal, 1 = enferma y 3 = muerta.
5. Calcular el índice del siguiente modo:

Síntomas clínicos	Días después de la inoculación (número de aves)								Total	Puntuación	
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Normal	10	4	0	0	0	0	0	0	14 x 0	= 0	
Enferma	0	6	10	4	0	0	0	0	20 x 1	= 20	
Muerta	0	0	0	6	10	10	10	10	46 x 2	= 92	
Total .....										112	

El índice será la puntuación media por ave y por observación = 112/80 = 1.4.

## 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 la solución salina isotónica amortiguadora de fosfato.

2. Preparar cultivos confluentes de una capa de células de embrión de gallina o una línea celular apropiada (por ejemplo, la línea de riñón de bovino de Madin-Barby) en placas de Petri de 5 cm 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 la solución salina isotónica amortiguadora de fosfato las células infectadas, se cubrirán con un medio apropiado que contenga agar-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 °C, las placas habrán alcanzado un tamaño adecuado. Para observarlas, conviene retirar la capa de agaragar y teñir el cultivo de una capa con cristal violeta (0,5 por 100 p/v) en etanol al 25 por 100 (p/v).

6. Todos los virus incubados en un medio que contenga tripsina producirán placas claras. Por el contrario, cuando los medios de cobertura no contengan tripsina, sólo producirán placas los virus virulentos para las gallinas.

## ANEXO IV

### Laboratorio nacional de referencia para la enfermedad de Newcastle

Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Algete.  
Carretera de Algete, kilómetro 5,400. 28110 Algete (Madrid)

Este texto consolidado no tiene valor jurídico.