

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 4 de agosto de 2006

por la que se aprueba un manual de diagnóstico de la gripe aviar, conforme a lo dispuesto en la Directiva 2005/94/CE del Consejo

[notificada con el número C(2006) 3477]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2006/437/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Vista la Directiva 2005/94/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2005, relativa a medidas comunitarias de lucha contra la influenza aviar y por la que se deroga la Directiva 92/40/CEE ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 50, apartado 1, párrafo segundo,

Considerando lo siguiente:

- (1) En la Directiva 2005/94/CE se establecen determinadas medidas preventivas relativas a la vigilancia y a la detección temprana de la gripe aviar, así como las medidas mínimas de lucha que deben aplicarse en caso de un foco de dicha enfermedad en aves de corral u otras aves cautivas.
- (2) Es necesario establecer a nivel comunitario procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación de un foco de gripe aviar.
- (3) El anexo VII de la Directiva 2005/94/CE establece las funciones y las tareas del laboratorio comunitario de referencia para la gripe aviar a fin de coordinar, de acuerdo con la Comisión, los métodos empleados en los Estados miembros para el diagnóstico de dicha enfermedad. Entre esas funciones y tareas se incluyen la organización periódica de pruebas comparativas y el suministro de reactivos de referencia a nivel comunitario.

(4) Recientemente se han desarrollado pruebas de laboratorio para garantizar un diagnóstico rápido de la gripe aviar.

(5) La experiencia adquirida en la lucha contra la gripe aviar durante los últimos años ha permitido determinar los procedimientos de muestreo y los criterios de evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio más adecuados para el diagnóstico correcto de esta enfermedad en situaciones diferentes.

(6) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Queda aprobado el manual de diagnóstico contemplado en la Directiva 2005/94/CE y que figura en el anexo de la presente Decisión.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán el manual de diagnóstico a partir de la fecha en que transpongan la Directiva 2005/94/CE o a partir del 1 de julio de 2007, si esta última fecha fuera anterior.

⁽¹⁾ DO L 10 de 14.1.2006, p. 16.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 4 de agosto de 2006

Por la Comisión
Markos KYPRIANOU
Miembro de la Comisión

ANEXO

MANUAL DE DIAGNÓSTICO DE LA GRIPE AVIAR

CAPÍTULO I

Introducción, objetivos y definiciones

1. A fin de garantizar unos procedimientos uniformes para el diagnóstico de la gripe aviar en la Comunidad, el presente manual de diagnóstico establece:
 - a) las directrices y los requisitos mínimos en relación con los procedimientos de diagnóstico, los métodos de muestreo y los criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con vistas al diagnóstico correcto de la gripe aviar;
 - b) las pruebas de laboratorio que deben utilizarse para el diagnóstico de la gripe aviar y las técnicas de laboratorio que deben utilizarse para la tipificación genética de las cepas clínicas del virus de la gripe aviar;
 - c) las exigencias mínimas de bioseguridad y las normas de calidad que deben cumplirse en los laboratorios de diagnóstico y en el transporte de las muestras.
2. El presente manual de diagnóstico se dirige a las autoridades responsables de la lucha contra la gripe aviar. Por tanto, se refiere sobre todo a los principios y las aplicaciones de las pruebas de laboratorio y a la evaluación de sus resultados, así como a las técnicas de laboratorio.
3. A los efectos del presente manual de diagnóstico, además de las definiciones que figuran en el artículo 2 de la Directiva 2005/94/CE se aplica asimismo la siguiente definición:

«muestra para diagnóstico»: cualquier material de origen animal, incluidos los cadáveres enteros transportados a efectos de diagnóstico o de investigación, pero excluidos los animales vivos infectados.
4. La confirmación de la gripe aviar en aves de corral u otras aves cautivas deberá ser conforme a los procedimientos, los métodos de muestreo y los criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio establecidos en el presente manual de diagnóstico, y deberá basarse en uno o más de los criterios que se exponen en las letras a), b) y c):
 - a) la detección del virus infeccioso, el antígeno o el material genético específico en muestras de aves de corral o tejidos de otras aves, órganos, sangre o excrementos;
 - b) la detección de signos clínicos y lesiones *post mortem* de la enfermedad en esas aves;
 - c) la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos en muestras de sangre de esas aves.
5. La confirmación de la infección de mamíferos por un virus de la gripe de tipo A de origen aviar que sea de alta patogenicidad o, si es de baja patogenicidad, de los subtipos H5 o H7, deberá basarse en uno o más de los criterios expuestos en las letras a) o b):
 - a) la detección del virus infeccioso de la gripe aviar, el antígeno o el material genético específico en muestras de tejidos, órganos, sangre o excrementos de mamíferos;
 - b) la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos a la gripe aviar en muestras de sangre de mamíferos.
6. Los procedimientos, los métodos de muestreo y los criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio deberán ser:
 - a) los establecidos en el presente manual de diagnóstico, o
 - b) los autorizados por la autoridad competente, a condición de que:
 - i) la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de laboratorio autorizadas hayan demostrado su eficacia a raíz de una prueba comparativa organizada por el laboratorio comunitario de referencia para la gripe aviar («el laboratorio comunitario de referencia»), o
 - ii) en caso de que el laboratorio comunitario de referencia no haya realizado tal evaluación para un tipo específico de prueba de laboratorio, el laboratorio nacional de referencia haya validado la sensibilidad y la especificidad de la prueba de laboratorio autorizada, de manera que dicha prueba de laboratorio se ajuste al propósito para el que se utiliza; los resultados de tal validación deberán ser presentados al laboratorio comunitario de referencia para su revisión.

CAPÍTULO II

*Descripción de la gripe aviar, con énfasis en el diagnóstico diferencial***1. Etiología y virulencia**

La gripe aviar es una infección vírica altamente contagiosa causada por virus de la familia *Orthomyxoviridae*, género *influenzavirus* A. Los virus de la gripe de tipo A son los únicos virus de dicha familia de los que consta que infectan a las aves. Numerosas especies de aves han demostrado ser propensas a infecciones por virus de la gripe de tipo A; las aves acuáticas constituyen un reservorio importante de tales virus, pero la inmensa mayoría de las cepas clínicas han sido cepas de baja patogenicidad en pollos y pavos, las principales aves con relevancia económica que se han visto afectadas por la enfermedad.

Los virus de la gripe de tipo A tienen nucleoproteínas relacionadas antigénicamente y proteínas de la matriz relacionadas antigénicamente, pero se clasifican en subtipos sobre la base de la relación antigénica de las glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Actualmente, se reconocen 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Cada virus de la gripe de tipo A tiene un antígeno HA y un antígeno NA, aparentemente en cualquier combinación.

Los virus de la gripe de tipo A se dividen en dos grupos con arreglo a su capacidad de causar la enfermedad en aves de corral sensibles:

- a) virus de la **gripe (o influenza) aviar de alta patogenicidad (IAAP)**, que causan una enfermedad sumamente grave caracterizada por la infección generalizada de las aves de corral infectadas, que puede dar lugar a una gran mortalidad en la manada (de hasta el 100 %), y
- b) virus de la **gripe (o influenza) aviar de baja patogenicidad (IABP)**, que causan una enfermedad leve, principalmente respiratoria, en las aves de corral, a menos que se produzca un agravamiento por otras coinfecciones u otros factores.

Las aves silvestres, especialmente las aves acuáticas migratorias, desempeñan un papel muy importante como reservorio de virus de la gripe de tipo A, como muestra el aislamiento de casi de todas las combinaciones posibles de subtipos de la HA y la NA en aves silvestres. En general, salvo cuando la gripe aviar de alta patogenicidad se ha propagado a partir de aves de corral infectadas, en las aves silvestres solo se detectan virus de la gripe aviar de baja patogenicidad.

Es muy probable que la introducción primaria de virus de la gripe aviar en las explotaciones avícolas se produzca por contacto directo o indirecto con aves silvestres.

En las aves de corral domésticas, existe la posibilidad de que tales virus de la gripe aviar de baja patogenicidad introducidos desde un reservorio silvestre circulen sin ser detectados, ya que a menudo no hay signos clínicos o estos son leves.

Una vez introducidas en las aves de corral, las cepas víricas de la gripe aviar de baja patogenicidad de los subtipos H5 y H7 pueden mutarse en cepas víricas de la gripe aviar de alta patogenicidad. Hasta la fecha, los virus de los subtipos H5 y H7 son los únicos de los que consta que causan la gripe aviar de alta patogenicidad.

Aunque parece que varios mecanismos pueden ser responsables de la mutación del virus de la gripe aviar de baja patogenicidad en el de la gripe aviar de alta patogenicidad, no se conocen los factores que producen dicha mutación. En algunos casos, la mutación parece haber tenido lugar rápidamente en el lugar primario tras haberse introducido a partir de aves silvestres; en otros casos, el virus de la gripe aviar de baja patogenicidad ha circulado en aves de corral durante meses antes de mutar. Por tanto, es imposible predecir si ocurrirá tal mutación, o cuándo ocurrirá. Sin embargo, puede asumirse razonablemente que, cuanto más circule la gripe aviar de baja patogenicidad en aves de corral, más ocasiones habrá de que se produzca dicha mutación.

El período de incubación es difícil de calcular y probablemente varíe en función de la cepa vírica y el hospedador, normalmente se indica un período de cinco a seis días, pero es probable que, para cada ave, el período oscile entre unas pocas horas y aproximadamente siete días.

2. Signos clínicos en aves infectadas con el virus de la gripe aviar de alta patogenicidad

Los signos clínicos son muy variables y se ven influidos por factores como la virulencia del virus infeccioso, la especie afectada, la edad, el sexo, las enfermedades coincidentes y el medio ambiente.

Entre los primeros signos cabe incluir la inapetencia, la reducción de la ingesta de agua y una mortalidad relativamente baja. Sin embargo, la enfermedad también puede aparecer repentinamente en una manada y muchas aves pueden morir sin signos premonitorios o con signos mínimos de depresión, inapetencia, plumas erizadas y fiebre. En general, cuanto más tiempo sobreviven las aves más acentuados son los signos clínicos. El plazo para el desarrollo de los signos depende del virus, el hospedador y la dosis infecciosa inicial, así como del sistema de producción avícola. El virus se propaga más lentamente en las aves ponedoras enjauladas y las aves al aire libre que en las baterías de engorde.

Las gallinas infectadas por el virus de la gripe aviar de alta patogenicidad pueden poner al principio huevos de cáscara blanda, pero al poco tiempo dejan de poner huevos. A menudo las aves enfermas se sientan o se quedan paradas en un estado semicomatoso, tocando el suelo con la cabeza. Las crestas y las barbas están cianóticas y edematosas, y pueden tener hemorragias petequiales o equimóticas en las puntas. A menudo se produce diarrea acuosa profusa y las aves tienen una sed excesiva. La respiración puede ser dificultosa y puede apreciarse un lagrimeo excesivo. Pueden apreciarse hemorragias en zonas de la piel carentes de plumas. Los índices de mortalidad en las manadas oscilan entre el 50 % y el 100 %.

En los pollos para carne, los signos de gripe aviar de alta patogenicidad son a menudo menos evidentes que en otras aves de corral y, entre ellos, se incluyen a menudo depresiones graves e inapetencia y la primera anomalía observada puede ser un aumento muy notable de la mortalidad. Asimismo, pueden apreciarse edemas en la cara y el cuello, y signos neurológicos como tortícolis y ataxia.

En los pavos, la gripe aviar de alta patogenicidad es similar a la observada en las aves domésticas, pero algunos virus de la gripe aviar de alta patogenicidad se presentan con mayor virulencia en estas aves, mientras que otros se presentan con menor virulencia.

En los gansos infectados por el virus de la gripe aviar de alta patogenicidad, los signos de depresión, inapetencia y diarrea son similares a los de las gallinas ponedoras, aunque frecuentemente con senos hinchados. Las aves más jóvenes pueden presentar signos neurológicos.

Es posible que los patos no presenten ningún signo clínico cuando están infectados por el virus de la gripe aviar de alta patogenicidad, pero hay constancia de que algunas cepas víricas producen signos similares a los de los gansos, con algo de mortalidad.

Es posible que no haya signos clínicos en las infecciones de avestruces por virus de la gripe aviar de alta patogenicidad y de la gripe aviar de baja patogenicidad. En algunos focos de gripe aviar de alta patogenicidad, como los que se produjeron en Italia en 1999/2000, se informó de que la pintada y la codorniz japonesa eran sensibles a las infecciones y presentaban unos signos y una mortalidad parecidos a los que produce la enfermedad en pollos y pavos. Sin embargo, en algunos estudios experimentales se ha informado de que las codornices son resistentes a algunas cepas víricas de la gripe aviar de alta patogenicidad. En todas las aves, la presencia de anticuerpos del mismo subtipo H tanto por vacunación como por infección natural puede significar que la infección por virus de la gripe aviar de alta patogenicidad no da lugar a signos clínicos manifiestos.

3. Lesiones *post mortem* en aves infectadas con el virus de la gripe aviar de alta patogenicidad

Las aves que mueren en una fase aguda pueden presentar lesiones macroscópicas mínimas, consistentes en la deshidratación y la congestión de vísceras y músculos.

En los cuerpos de las aves que mueren después de una evolución clínica prolongada se observan hemorragias petequiales y equimóticas, en especial en la laringe, la tráquea, el proventrículo y la grasa epicárdica, así como en superficies serosas adyacentes al esternón. Asimismo, se observa un edema subcutáneo amplio, en particular alrededor de la cabeza y los corvejones. El cadáver puede estar deshidratado. Puede haber focos necróticos amarillos o grises en el bazo, el hígado, los riñones y los pulmones. El alvéolo puede contener un exudado. El bazo puede encontrarse dilatado y hemorrágico.

La gripe aviar se caracteriza histológicamente por trastornos vasculares que dan lugar a edemas, hemorragias y manguitos perivasculares, especialmente en el miocardio, el bazo, los pulmones, el cerebro, el páncreas y las barbas. Se dan focos necróticos en los pulmones, el hígado y los riñones. En el cerebro puede producirse gliosis, proliferación vascular y degeneración neuronal.

4. Diagnóstico diferencial

En el diagnóstico diferencial de la gripe aviar de alta patogenicidad deberán considerarse, en particular, las enfermedades siguientes:

- a) otras enfermedades que causan una mortalidad elevada repentina, como:
 - i) la enfermedad de Newcastle,
 - ii) la laringotraqueítis infecciosa,

- iii) la peste del pato,
- iv) las intoxicaciones agudas;
- b) otras enfermedades que causan la prominencia de crestas y barbas, como:
 - i) el cólera aviar agudo y otras enfermedades septicémicas,
 - ii) la celulitis bacteriana de la cresta y las barbas.

5. Signos clínicos en aves infectadas por el virus de la gripe aviar de baja patogenicidad

La gravedad de la enfermedad producida por los virus de la gripe aviar de baja patogenicidad depende en gran medida de:

- a) la cepa vírica;
- b) la especie y la edad del hospedador;
- c) la inmunidad del hospedador contra el virus y, en particular, la presencia de otros agentes infecciosos, como:
 - i) el género *Pasteurella*,
 - ii) los virus de la enfermedad de Newcastle (incluidas las cepas vacunales),
 - iii) neumovirus aviar, virus de la bronquitis infecciosa,
 - iv) *E. coli*,
 - v) el género *Mycoplasma*;
- d) condiciones de inmunodeficiencia;
- e) factores medioambientales (como el exceso de amoníaco o de polvo y unas temperaturas excesivamente calientes o frías).

En un extremo, los signos clínicos de la enfermedad apreciados pueden ser latentes o leves, como signos respiratorios leves o problemas de las aves ponedoras para producir huevos. En el otro extremo, las infecciones por virus de la gripe aviar de baja patogenicidad pueden estar asociadas a signos clínicos graves de la enfermedad, especialmente en pavos, que presentan generalmente estertores, tos, hinchazón de los senos infraorbitarios y fiebre, junto con pérdida de apetito y una elevada mortalidad.

La gripe aviar de baja patogenicidad puede confundirse con muchas de las enfermedades que presentan signos respiratorios o intestinales, o complicarse por la presencia de tales enfermedades. Se deberá sospechar de la presencia de gripe aviar en cualquier foco de la enfermedad en aves de corral que persista a pesar de la aplicación de medidas preventivas y terapéuticas respecto a otras enfermedades.

6. Signos clínicos en aves cautivas

La gama de signos clínicos puede ser muy amplia y, al igual que en las aves de corral, puede abarcar desde signos latentes hasta signos graves de la enfermedad que den lugar a una mortalidad elevada.

En general, la infección se propaga más despacio en un grupo de aves cautivas debido a la variedad de las especies, que presentan una propensión diferente, distintos niveles de eliminación de los virus y una transmisión a menudo relativamente lenta, a causa de un reducido índice de contacto y a una densidad de población relativamente baja.

CAPÍTULO III

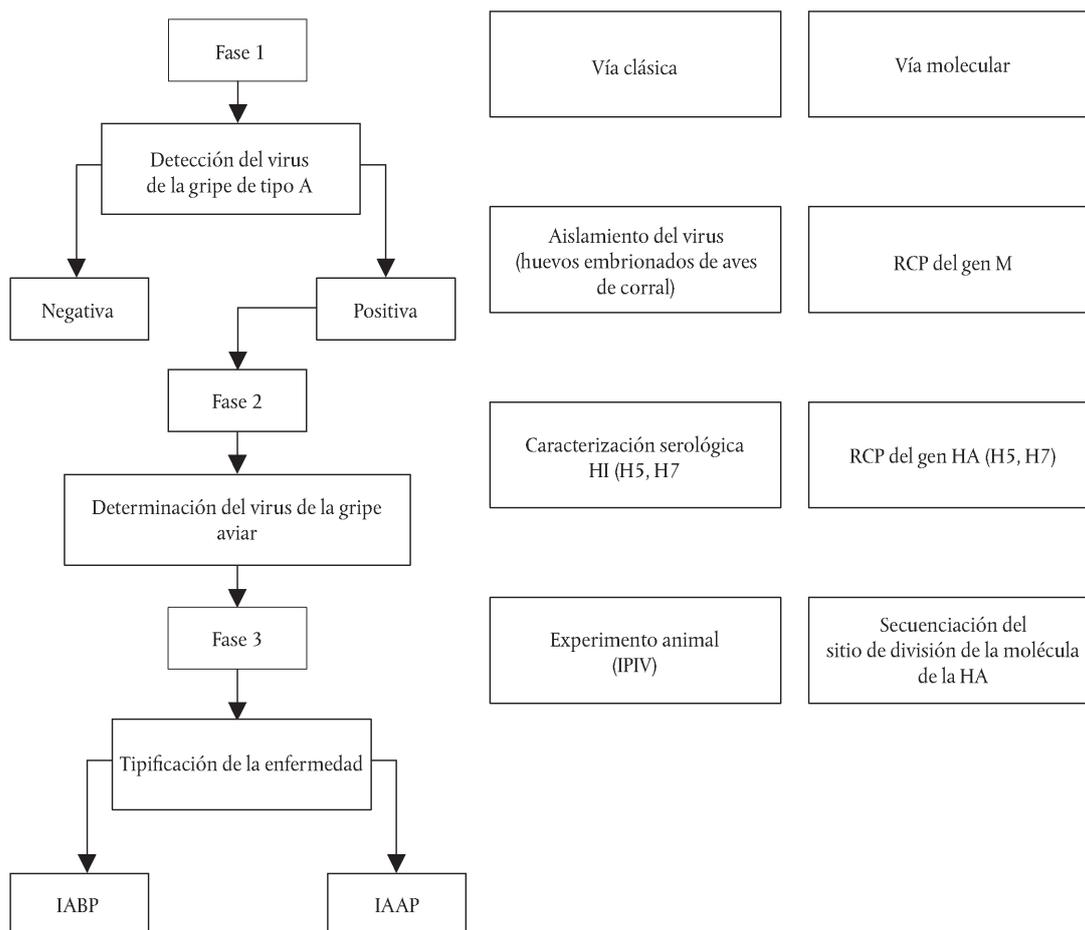
Directrices que deben tenerse en cuenta en caso de sospecha de gripe aviar en una explotación

La variabilidad de los signos clínicos tanto en el caso de la gripe aviar de alta patogenicidad como en el de la gripe aviar de baja patogenicidad implica la imposibilidad de contar con unas orientaciones categóricas en caso de sospecha de un foco. Una mortalidad elevada y repentina en aves de corral, ya sea con los signos clínicos asociados descritos en el capítulo II o sin ninguno de ellos, deberá ser investigada en un laboratorio previa presentación de muestras, pero a falta de una mortalidad elevada, es más difícil sospechar o excluir la presencia de gripe aviar.

Habida cuenta de que el diagnóstico rápido de la gripe aviar de alta patogenicidad y la gripe aviar de baja patogenicidad causadas por los subtipos H5 y H7 es de vital importancia para un control y una erradicación precoces, siempre deberá tenerse en cuenta la gripe aviar en el diagnóstico diferencial de los problemas respiratorios, los problemas de producción de huevos y de una mortalidad elevada en las aves de corral, y deberán presentarse muestras apropiadas para su investigación en un laboratorio.

Figura

Esquema de las fases de diagnóstico para confirmar la gripe aviar



CAPÍTULO IV

Procedimientos generales para la obtención y el transporte de las muestras

1. La Directiva 2005/94/CE y el manual de diagnóstico

Cuando en la Directiva 2005/94/CE se haga referencia al manual de diagnóstico, deberán llevarse a cabo las investigaciones y los procedimientos de muestreo y vigilancia que se exponen en el presente capítulo del manual de diagnóstico.

2. Procedimientos que deberán seguirse en caso de sospecha de focos de gripe aviar

Cuando el veterinario oficial tenga una sospecha clínica de un foco de gripe aviar o cuando los resultados de alguna prueba de laboratorio sobre dicha enfermedad no sean negativos, la autoridad competente deberá velar por que se lleve a cabo una investigación, según lo establecido en el presente capítulo del manual de diagnóstico, de conformidad con el artículo 7 de la Directiva 2005/94/CE, y se complete satisfactoriamente antes de excluir la presencia de la enfermedad.

3. Interpretación de las pruebas virológicas

La autoridad competente podrá establecer que la presencia del virus de la gripe aviar puede excluirse cuando se haya presentado un número apropiado de aves enfermas o muertas y de hisopos traqueales/bucofaríngeos o de cloaca, conforme a lo dispuesto en el presente capítulo, para la detección de dicho virus o su genoma y las pruebas realizadas utilizando uno de los métodos de detección de virus mencionados en los capítulos V o VI, o aprobados por la autoridad competente conforme al capítulo I, punto 6, letra b), hayan dado resultados negativos.

4. Conjunto de muestras patrón para las pruebas virológicas o serológicas de laboratorio

Para investigar una explotación sospechosa de haber sido infectada por el virus de la gripe aviar, el conjunto de muestras patrón para las pruebas virológicas o serológicas mencionadas en las letras a) y b) («las muestras patrón») deberá ser recogido y sometido directamente a pruebas virológicas y serológicas de laboratorio.

a) El conjunto de muestras patrón para las pruebas virológicas constará de:

- i) al menos, cinco aves enfermas o muertas, en caso de haberlas, y/o
- ii) al menos, 20 hisopos traqueales/bucofaríngeos y 20 hisopos de cloaca.

Los cadáveres deberán ser de aves que hayan muerto recientemente o que estén gravemente enfermas o moribundas y hayan sido sacrificadas de forma compasiva.

Deberán tomarse hisopos del número de aves mencionado en la letra a) o de todas las aves de la explotación sospechosa, en caso de que haya un número inferior de aves. Deberán incluirse en el muestreo de forma prioritaria aves que tengan signos clínicos de la enfermedad.

Los hisopos de cloaca deberán estar cubiertos de heces (cantidad óptima: 1 g). Si, por algún motivo, no se pueden recoger hisopos de cloaca de aves vivas, algunas muestras de heces recientes cuidadosamente recogidas podrán servir como alternativa.

A menudo es más práctico recoger hisopos traqueales/bucofaríngeos de la cavidad bucal.

En cuanto se conozcan las características de crecimiento del virus, la autoridad competente podrá decidir si opta por hisopos traqueales/bucofaríngeos o por hisopos de cloaca, o por recoger ambos, dependiendo de si el virus se reproduce mejor en el aparato respiratorio o en el tubo digestivo y teniendo en cuenta, asimismo, la especie de que se trate.

b) El conjunto de muestras patrón para las pruebas serológicas constará de 20 muestras de sangre como mínimo.

Deberán recogerse hisopos del número de aves mencionado en la letra b) o, en caso de que haya un número inferior de aves, de todas las aves de la explotación. Las aves con aspecto de enfermas o que se hayan recuperado aparentemente deberán ser incluidas en el muestreo.

La autoridad competente podrá decidir que no es necesario recoger toda la gama de muestras patrón, sino que basta con un subconjunto de las mismas.

5. Transporte de las muestras

Deberán tomarse precauciones específicas para la conservación y el transporte de las muestras hasta el laboratorio donde se realizarán las pruebas.

Los hisopos deberán refrigerarse inmediatamente con hielo o bolsas de gel congelado y presentarse en el laboratorio lo antes posible. Las muestras no deberán estar congeladas a menos que sea absolutamente necesario. Si no puede garantizarse un transporte rápido hasta el laboratorio en un plazo de 24 horas, las muestras deberán congelarse inmediatamente, conservarse y, después, transportarse con hielo seco.

Además —y no como alternativa a la refrigeración—, los hisopos deberán colocarse en un medio de transporte con antibióticos o para virus específicos a una temperatura de 4 °C de manera que estén totalmente sumergidos. A falta de tal medio, los hisopos deberán volver a colocarse en su estuche y presentarse en seco al laboratorio donde se realizarán las pruebas.

La conservación y el transporte de las muestras pueden verse afectados por una serie de factores, de manera que el método seleccionado para el transporte deberá ser adecuado para los fines perseguidos.

6. Medio con antibióticos

El medio con antibióticos mencionado en el punto 5 deberá basarse en una solución salina amortiguadora de fosfatos con un pH de 7,0-7,4 (comprobado después de haber añadido los antibióticos).

Los medios basados en las proteínas, como el caldo de infusión cerebro-corazón o de triptosa amortiguadora tris, pueden aportar estabilidad al virus, especialmente durante el transporte. Los antibióticos utilizados y su concentración pueden modificarse a fin de adaptarse a las condiciones y la disponibilidad de cada lugar.

Para las muestras fecales, podrán necesitarse niveles de antibióticos muy elevados; los niveles adecuados son los siguientes: 10 000 IU/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina, 0,25 mg/ml de gentamicina y 5 000 IU/ml de nistatina. Estos niveles podrán llegar a ser hasta cinco veces inferiores cuando se trate de tejidos e hisopos traqueales.

Si se desea un control de *Chlamydia*, deberán incluirse entre 0,05 y 0,1 mg/ml de oxitetraciclina.

7. Medio con infusión de cerebro-corazón

La disolución deberá estar preparada con agua y contener un 15 % (p/v) de polvo de caldo de infusión de cerebro-corazón, antes de la esterilización (en autoclave a 121 °C durante 15 minutos).

Tras la esterilización, deberán añadirse los antibióticos como sigue: 10 000 IU/ml de penicilina G, 20 µg de anfotericina B y 1 000 µg/ml de gentamicina. Los medios podrán conservarse a 4 °C durante dos meses como máximo.

8. Procedimientos que deberán llevarse a cabo respecto a las disposiciones pertinentes de la Directiva 2005/94/CE

8.A. Sospecha de foco

8.1. Artículo 7, apartado 1: Medidas que se aplicarán en las explotaciones en caso de sospecha de foco

En caso de que un veterinario oficial inspeccione una explotación con un presunto foco, deberán adoptarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros. En el informe de inspección realizado por el veterinario oficial deberán documentarse los datos sobre mortalidad diaria y los datos sobre la producción diaria de huevos, así como la ingesta diaria de piensos y agua correspondientes al período comprendido entre una semana antes de la fecha del inicio de los signos clínicos de gripe aviar y la fecha de la inspección de la explotación por el veterinario oficial;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) a menos que la autoridad competente esté convencida de que puede excluirse una sospecha de foco sobre la base de la inspección clínica con arreglo a las letras a) y b), deberán tomarse muestras patrón de cada unidad de producción;
- d) independientemente de que las pruebas de las muestras patrón den resultados negativos y en función de los factores locales, deberá realizarse una inspección clínica de las aves de corral en cada unidad de producción antes de que pueda levantarse la vigilancia oficial.

8.2. Artículo 10, apartado 3: Medidas complementarias basadas en una encuesta epidemiológica

Las muestras patrón deberán obtenerse, en cada unidad de producción, de aves de corral u otras aves cautivas que sean sacrificadas.

8.B. Gripe aviar de alta patogenicidad

8.3. Artículo 11, apartado 4: Medidas que deberán aplicarse en casos de aves de corral que hayan nacido de huevos recogidos en explotaciones con focos confirmados

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación con aves de corral que hayan nacido de huevos recogidos durante el período de incubación en una explotación en la que se haya confirmado la gripe aviar de alta patogenicidad, deberán adoptarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación. En el informe de inspección de la explotación realizado por el veterinario oficial deberán documentarse los datos de mortalidad diaria y los datos sobre la ingesta diaria de piensos y agua, si se dispone de ellos, durante el período comprendido entre una semana antes de la fecha del inicio de los signos clínicos de gripe aviar de alta patogenicidad y la fecha de la inspección de la explotación por el veterinario oficial;

- b) una inspección clínica en cada unidad de producción y una exploración clínica de las aves de corral, en especial las que parezcan enfermas o no crecen como se esperaba;
- c) deberán recogerse muestras patrón de aves de corral de entre dos y tres semanas de edad;
- d) podrá levantarse la vigilancia oficial de la explotación después de una exploración clínica de las aves de corral de más de 21 días de edad y si las pruebas de las muestras patrón han resultado negativas.

8.4. *Artículo 13, apartado 2, letra b): Excepciones relativas a determinadas explotaciones*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación a la que se ha concedido una excepción al artículo 11, apartado 2, párrafo primero, de la Directiva 2005/94/CE, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) en lugar de las muestras patrón, 21 días después de la fecha del último caso positivo de gripe aviar de alta patogenicidad de cada unidad de producción y en intervalos de 21 días deberán recogerse las muestras siguientes para las pruebas de laboratorio:
 - i) muestras de cualquier ave de corral muerta u otras aves cautivas presentes en el momento del muestreo,
 - ii) cuando sea factible, hispos traqueales o bucofaríngeos y de cloaca de al menos 60 aves de corral u otras aves cautivas o de todas las aves de corral u otras aves cautivas, en caso de que el número de dichas aves en la explotación sea inferior a 60; o, en caso de que las aves sean pequeñas, exóticas y no estén acostumbradas a ser manipuladas o de que manipularlas fuera peligroso para las personas, deberán obtenerse muestras de heces recientes.

No obstante, la autoridad competente podrá conceder excepciones al tamaño de la muestra mencionada en los incisos i) y ii), sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo;

- d) el muestreo mencionado en la letra c) y las pruebas de laboratorio de tales muestras deberán continuar hasta que se obtengan, con una diferencia de al menos 21 días, dos resultados negativos consecutivos en las pruebas de laboratorio.

8.5. *Artículo 15, apartados 1 y 3: Medidas que se aplicarán en las explotaciones de contacto*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación de contacto, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros. En el informe de inspección de la explotación realizado por el veterinario oficial deberán documentarse los datos de mortalidad diaria y los datos sobre la ingesta diaria de piensos y agua, si se dispone de ellos, durante el período comprendido entre una semana antes de la fecha de contacto con la manada de la que se sospecha que está infectada con la gripe aviar y la fecha de la inspección de la explotación por el veterinario oficial;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) en caso de que haya signos clínicos en aves de corral u otras aves cautivas, o indicaciones de un aumento de la mortalidad diaria (> 3 veces el índice de mortalidad normal de la manada), un descenso acentuado de la producción diaria de huevos (> 5 %) o una disminución de la ingesta diaria de piensos o agua (> 5 %), deberán recogerse inmediatamente muestras patrón de cada unidad de producción;
- d) en caso de que no existan los signos mencionados en las letras b) y c), las muestras patrón deberán recogerse 21 días después de la última sospecha de contacto con una explotación infectada o cuando las aves de corral u otras aves cautivas sean sacrificadas.

8.6. *Artículo 18, letras b) y c): Censo, visitas del veterinario oficial y vigilancia en las explotaciones de la zona de protección*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación comercial, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación. En caso de que haya indicios de un aumento de la mortalidad diaria (> 3 veces el índice de mortalidad normal de la manada), un descenso acentuado de la producción diaria de huevos (> 5 %) o una disminución de la ingesta diaria de piensos o de agua (> 5 %), deberán recogerse muestras patrón de cada unidad de producción;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral y otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;

- c) en caso de que no se espere que las especies de aves de corral u otras aves cautivas manifiesten claramente signos clínicos de la enfermedad, o en caso de que las aves estén vacunadas, la autoridad competente podrá decidir, sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo, que se recojan muestras patrón de cada unidad de producción;
- d) sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo, la autoridad competente deberá decidir si lleva a cabo una vigilancia oficial adicional mediante inspecciones clínicas y un muestreo para pruebas de laboratorio en explotaciones, compartimentos o tipos de producción específicos.

8.7. *Artículo 19, letra f): Medidas que se aplicarán en las explotaciones en las zonas de protección*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación sobre la que se ha notificado un aumento de la morbilidad o de la mortalidad, o un cambio en los datos de producción, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación. En caso de que haya indicios de un aumento de la mortalidad diaria (> 3 veces el índice de mortalidad normal de la manada), un descenso acentuado de la producción diaria de huevos (> 5 %) o una disminución de la ingesta diaria de piensos o de agua (> 5 %), deberán recogerse muestras patrón de cada unidad de producción;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas.

8.8. *Artículo 23, letra b): Excepciones para el transporte directo de aves de corral para su sacrificio inmediato*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación a la que se ha concedido una excepción al artículo 22 de la Directiva 2005/94/CE, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de cualquier ave de corral, en especial las que parezcan enfermas en las 24 horas anteriores a la salida de las aves de corral;
- c) sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo realizada por la autoridad competente y en lugar de las muestras patrón, deberán tomarse, como mínimo, 60 hisopos traqueales/bucofaringeos o 60 hisopos de cloaca de aves de corral de cada unidad de producción que vaya a enviarse para su sacrificio en las 48 horas anteriores a la salida de las aves de corral.

8.9. *Artículo 25, letra b): Excepciones para el transporte directo de pollitas maduras para la puesta*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación a la que se haya concedido una excepción al artículo 22 antes del transporte directo de las pollitas maduras para la puesta, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral, en especial las que parezcan enfermas en las 24 horas anteriores a la salida de las aves de corral;
- c) sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo realizado por la autoridad competente y en lugar de las muestras patrón, deberán tomarse, como mínimo, 60 hisopos traqueales/bucofaringeos o hisopos de cloaca de las aves de corral de cada unidad de producción que vayan a transportarse en las 48 horas anteriores a la salida de las aves de corral.

8.10. *Artículo 26, apartado 1, letra a): Excepciones para el transporte directo de huevos para incubar y de huevos de mesa*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación, con una manada de la que proceden los huevos para incubar, a la que se haya concedido una excepción al artículo 22 antes del transporte directo de dichos huevos, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción cada 15 días;
- c) deberán recogerse muestras patrón de cada unidad de producción;

8.11. *Artículo 29, apartado 1: Duración de las medidas*

Podrán levantarse las medidas que se aplican en la zona de protección de conformidad con el capítulo IV, sección 3, de la Directiva 2005/94/CE una vez que hayan transcurrido 21 días a partir de la fecha de limpieza preliminar y desinfección de las explotaciones infectadas, a condición de que:

- a) todas las explotaciones comerciales situadas en la zona de protección hayan sido inspeccionadas por un veterinario oficial y todos los controles, todas las inspecciones clínicas y todas las pruebas de laboratorio, conforme a lo dispuesto en el punto 8.6, letras a), b) y c), y en el punto 8.7 hayan dado resultado negativo;
- b) todas las explotaciones no comerciales identificadas en la zona de protección hayan sido inspeccionadas por un veterinario oficial y ni el examen clínico ni los resultados de ninguna prueba de laboratorio realizada induzcan a sospechar de una infección de gripe aviar;
- c) cualquier vigilancia oficial adicional que se haya llevado a cabo, conforme a lo dispuesto en el punto 8.6, letra d), haya dado resultado negativo.

8.12. *Artículo 30, letra g): Medidas que se aplicarán en las zonas de vigilancia*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación sobre la que se ha notificado un aumento de la morbilidad o de la mortalidad, o un cambio en los datos de producción, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) deberán recogerse muestras patrón de cada unidad de producción.

8.13. *Artículo 35: Investigación de una presunta gripe aviar de alta patogenicidad en mataderos y en medios de transporte*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación de origen de aves en mataderos o medios de transporte, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de aves de corral u otras aves cautivas, teniendo en cuenta la consulta con el veterinario oficial del matadero, que deberá facilitar información sobre los datos previos de inspección y los resultados de los exámenes *ante-mortem* y *post-mortem*;
- c) a menos que la autoridad competente esté convencida de que puede excluirse la sospecha de gripe aviar de alta patogenicidad sobre la base de la investigación veterinaria con arreglo a las letras a) y b), deberán tomarse muestras patrón de cada unidad de producción;
- d) además de las muestras patrón, deberán someterse a pruebas de laboratorio muestras de al menos cinco aves enfermas, muertas o sacrificadas en el matadero, que presenten signos patológicos.

8.14. *Artículo 36, apartado 1: Medidas que se aplicarán en los mataderos*

Una vez que hayan concluido las investigaciones mencionadas en el punto 8.13, y a condición de que los resultados de los pruebas de laboratorio sean negativos y no haya ninguna sospecha clínica de gripe aviar de alta patogenicidad en la explotación de origen ni en el matadero, podrá levantarse la supervisión oficial.

8.15. *Artículo 37, apartados 1) y 2): Medidas que se aplicarán en los puestos fronterizos de control o en los medios de transporte*

8.15.1. Cuando un veterinario oficial examine aves de corral u otras aves cautivas que permanezcan aisladas, que se hayan desplazado de un puesto fronterizo de control o de un medio de transporte, debido a la sospecha o la confirmación de gripe aviar de alta patogenicidad, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los documentos y registros pertinentes, en caso de que existan tales documentos o registros;
- b) un examen clínico de dichas aves de corral o aves cautivas que permanezcan aisladas y una inspección clínica de cualquier otra ave de corral o ave cautiva de otro tipo, en especial las que parezcan enfermas;
- c) deberán recogerse muestras patrón de aves de corral u otras aves cautivas seleccionadas de distintas cajas o jaulas de transporte.

- 8.15.2. Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación de origen identificada, en caso de que las aves de corral u otras aves cautivas sean sacrificadas, deberán tomarse las medidas siguientes:
- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros;
 - b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de aves de corral u otras aves cautivas, teniendo en cuenta la consulta con el veterinario oficial del matadero, que deberá detallar los datos de las inspecciones previas y los resultados de los exámenes *ante-mortem* y *post-mortem*;
 - c) a menos que la autoridad competente esté convencida de que puede excluirse la sospecha de gripe aviar de alta patogenicidad sobre la base de la investigación veterinaria con arreglo a las letras a) y b), deberán tomarse muestras patrón de cada unidad de producción;
 - d) además de las muestras patrón mencionadas en la letra c), deberán someterse a pruebas de laboratorio muestras de al menos cinco aves enfermas, muertas o sacrificadas en el matadero, que presenten signos patológicos;
 - e) a condición de que los resultados de las pruebas de laboratorio de las muestras mencionadas en las letras c) y d) sean negativos y no haya ninguna sospecha clínica de gripe aviar de alta patogenicidad en la explotación de origen ni en el matadero, podrá levantarse la supervisión oficial.

8.C. Gripe aviar de baja patogenicidad

- 8.16. *Artículo 39, apartado 6, letras b) y h): Medidas que se aplicarán en las explotaciones con focos confirmados de gripe aviar de baja patogenicidad*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación, antes del transporte de las aves de corral a un matadero, o una explotación con aves de corral que hayan nacido de huevos recogidos de la explotación durante el período de incubación, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica de cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas;
- c) deberán recogerse muestras patrón de aves de cada unidad de producción que vaya a enviarse al matadero en las 48 horas anteriores a la salida de las aves de corral;
- d) en cada unidad de producción deberán tomarse muestras patrón de aves de corral que hayan nacido de huevos recogidos de la explotación durante el período de incubación.

- 8.17. *Artículo 40, apartado 2, letra b): Excepciones para determinadas explotaciones a las medidas que deberán adoptarse en caso de que se confirmen los focos*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación a la que se haya concedido una excepción al artículo 39, apartado 2, y al artículo 39, apartado 5, letra b), de la Directiva 2005/94/CE, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción a intervalos regulares, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) en lugar de las muestras patrón, 21 días después de la fecha de los últimos casos positivos de gripe aviar de baja patogenicidad de cada unidad de producción y en intervalos de 21 días, deberán recogerse las muestras siguientes durante las pruebas de laboratorio:
 - i) muestras de cualquier ave de corral muerta u otras aves cautivas presentes en el momento del muestreo,
 - ii) hisopos traqueales/bucofaríngeos y de cloaca de 60 aves de corral y otras aves cautivas o de todas las aves de corral y otras aves cautivas en caso de que, en la explotación, haya menos de 60; o, en caso de que las aves de corral u otras aves cautivas sean pequeñas, exóticas y no estén acostumbradas a ser manipuladas o de que manipularlas fuera peligroso para las personas, deberán recogerse muestras de heces recientes.

No obstante, la autoridad competente podrá conceder excepciones al tamaño de las muestras mencionado en los incisos i) y ii), sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo;

- d) el muestreo mencionado en la letra c) y las pruebas de laboratorio de tales muestras deberán continuar hasta que se obtengan, con una diferencia de al menos 21 días, dos resultados negativos consecutivos en las pruebas de laboratorio.

8.18. *Artículo 42, apartados 1 y 3: Medidas que se aplicarán en las explotaciones de contacto*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación de contacto, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación de contacto, en caso de que existan dichos registros;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) deberán tomarse muestras patrón de cada unidad de producción o cuando se sacrifiquen las aves de corral u otras aves cautivas.

8.19. *Artículo 44, apartado 1, letra b): Medidas que se aplicarán en zonas restringidas*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación comercial en una zona restringida, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) deberán recogerse muestras patrón de cada unidad de producción;
- d) sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo, la autoridad competente deberá decidir si efectúa una vigilancia oficial adicional mediante inspecciones clínicas y un muestreo para pruebas de laboratorio en explotaciones, compartimentos o tipos de producción específicos.

8.20. *Artículo 45, letras a) y b): Duración de las medidas*

Podrán levantarse las medidas que se aplican en la zona restringida de conformidad con el capítulo V, sección 3, de la Directiva 2005/94/CE una vez que hayan transcurrido 21 días a partir de la fecha de limpieza y desinfección preliminares de las explotaciones infectadas, tras el vaciado de la explotación o una vez que hayan transcurrido 42 días a partir de la fecha de confirmación de la gripe aviar de baja patogenicidad, a condición de que:

- a) todas las explotaciones comerciales de la zona restringida hayan sido inspeccionadas por un veterinario oficial, todas las pruebas de laboratorio de las muestras mencionadas en el punto 8.13, letras c) y d), hayan sido realizadas y sus resultados estén disponibles;
- b) se disponga de los resultados de cualquier otra inspección clínica o prueba de laboratorio que puedan contemplar explotaciones no comerciales para determinar el riesgo de que se propague la gripe aviar de baja patogenicidad;
- c) la autoridad competente esté convencida, sobre la base del resultado de una evaluación del riesgo y teniendo en cuenta la situación epidemiológica y los resultados de las pruebas de laboratorio mencionadas en las letras a) y b), de que el riesgo de propagación de la gripe aviar de baja patogenicidad es desdeñable; en dicha evaluación se podrá concluir que, en caso de obtener resultados serológicos positivos y resultados virológicos negativos, podrán levantarse las restricciones.

8.D. *Medidas destinadas a evitar la propagación de los virus de la gripe aviar a otras especies*

8.21. *Artículo 47, apartados 1) y 6): Pruebas de laboratorio y demás medidas relativas a los cerdos y a otros animales*

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación en la que haya cerdos y se haya confirmado la gripe aviar, deberán tomarse las siguientes medidas:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación, en caso de que existan dichos registros;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y exploraciones clínicas de los cerdos, en especial de los que parezcan enfermos;
- c) antes del día en que se sacrifiquen en masa las aves de corral infectadas u otras aves cautivas, o ese mismo día, deberán recogerse hisopos nasales/bucofaríngeos de al menos 60 cerdos de cada unidad de producción, o de todos los cerdos, en caso de que haya menos de dicha cifra en la unidad de producción. Deberán obtenerse, como mínimo, 60 muestras de sangre de los cerdos entre dos y cuatro semanas después de la fecha del sacrificio masivo. Las muestras deberán recogerse de tal manera que al menos una muestra proceda de grupos de cerdos que estén en contacto directo entre sí;

- d) se podrá autorizar el desplazamiento de cerdos a otras explotaciones en caso de que al menos 60 hisopos nasales/bucofaríngeos y 60 muestras de sangre recogidos de cerdos de cada unidad de producción, 14 días después de la fecha de confirmación de la gripe aviar, hayan dado resultado negativo.

Se podrá autorizar el desplazamiento de cerdos a un matadero en caso de que al menos 60 hisopos nasales/bucofaríngeos recogidos de cerdos de cada unidad de producción, 14 días después de la fecha de confirmación de la gripe aviar, hayan dado resultado negativo.

En caso de que los resultados del laboratorio sean poco concluyentes o positivos, se realizará cualquier otra investigación necesaria para excluir la infección o la transmisión de la gripe aviar entre los cerdos;

- e) en caso de que el veterinario sospeche que otros mamíferos domésticos de las explotaciones, en especial aquellos cuya sensibilidad a la infección por virus de la gripe aviar de los subtipos H5 y H7 haya sido determinada, puedan haber estado en contacto con las aves de corral u otras aves cautivas infectadas, deberán recogerse muestras para realizar pruebas de laboratorio.

8.E. Repoblación

8.22. Artículo 49, apartado 3, letras b) y c): Repoblación de las explotaciones

Cuando un veterinario oficial inspeccione una explotación comercial que haya sido repoblada, deberán tomarse las medidas siguientes:

- a) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación;
- b) una inspección clínica en cada unidad de producción que incluya una evaluación de su historial clínico y las exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas, en especial las que parezcan enfermas;
- c) en lugar de las muestras patrón, deberán recogerse de cada unidad de producción las muestras siguientes:
- i) al menos 20 muestras de sangre en cuanto las aves de corral se hayan colocado en la explotación, excepto en el caso de los pollitos de un día; si procede, tal muestreo podrá realizarse en la explotación de origen de las aves de corral antes de que se produzca el desplazamiento a la explotación para la repoblación,
- ii) muestras de aves de corral muertas, o hisopos recogidos de sus cadáveres, de un máximo de 10 aves muertas por semana durante el período de 21 días a partir de la fecha de la repoblación;
- d) en caso de que la explotación haya estado infectada anteriormente por la gripe aviar de alta patogenicidad, también deberán recogerse 20 hisopos traqueales/bucofaríngeos y 20 hisopos de cloaca de aves acuáticas (patos/gansos) de cada unidad de producción, si procede, durante la última semana del período de 21 días a partir de la fecha de repoblación;
- e) en caso de que la explotación haya estado infectada anteriormente por gripe aviar de baja patogenicidad, deberán tomarse 20 hisopos traqueales/bucofaríngeos, 20 hisopos de cloaca y 20 muestras de sangre de cada unidad de producción.

8.F. Vacunación

8.23. Artículo 56, apartado 2, letra i): Vacunación preventiva de las aves de corral u otras aves cautivas

Con arreglo a lo dispuesto en el capítulo IX de la Directiva 2005/94/CE, las pruebas de laboratorio que se realicen en las aves de corral u otras aves cautivas vacunadas deberán ajustarse a los ensayos DIVA aprobados, en caso de que se conozca el virus de campo.

Cuando se utilicen aves centinela, estas deberán estar presentes en cada manada vacunada, ser examinadas clínicamente y probadas mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). A tal fin, como mínimo cada 60 días, se tomarán 20 muestras de sangre de las aves centinela no vacunadas de cada explotación vacunada.

8.24. Anexo IX: Requisitos generales sobre los desplazamientos de aves de corral y otras aves cautivas y de productos avícolas aplicables en relación con la vacunación de urgencia

Deberán aplicarse medidas estrictas de seguimiento a los desplazamientos de aves de corral y otras aves cautivas vivas y de sus huevos a fin de minimizar el riesgo de propagación de la infección de gripe aviar.

A tal fin, al principio de una campaña de vacunación de urgencia deberán aplicarse las mismas medidas de seguimiento respecto a los desplazamientos de aves de corral y otras aves cautivas vivas y de sus huevos a fin de minimizar el riesgo de propagación de la infección de gripe aviar tanto dentro como fuera de la zona de vacunación.

- a) Antes del primer desplazamiento dentro y fuera de la zona de vacunación de huevos para incubar y huevos de mesa y, a partir de entonces, como mínimo cada 30 días, el veterinario oficial deberá tomar las medidas siguientes:
- i) una inspección clínica de las aves de corral reproductoras o las aves ponedoras sin vacunar de cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y exploraciones clínicas de las aves de corral, en especial de las que parezcan enfermas; deberán recogerse muestras patrón de aves de corral de cada unidad de producción, o
 - ii) una inspección clínica de las aves de corral reproductoras o aves ponedoras sin vacunar de cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y exploraciones clínicas de las aves centinela presentes en dichas manadas; deberán recogerse muestras patrón de dichas aves centinela.
- b) Respecto a los desplazamientos de aves de corral u otras aves cautivas vivas vacunadas a otras explotaciones o respecto a los desplazamientos de aves de corral vivas vacunadas dentro y fuera de la zona de vacunación, el veterinario oficial deberá tomar las medidas siguientes:
- i) un control de los registros de producción y sanitarios de la explotación,
 - ii) una inspección clínica en cada unidad de producción, que incluya una evaluación de su historial clínico y exploraciones clínicas de las aves de corral u otras aves cautivas durante las 72 horas anteriores a la hora de salida, con especial atención a las aves centinela,
 - iii) en caso de que los resultados de los controles y de la inspección clínica y los exámenes mencionados en los incisos i) y ii) no sean satisfactorios, deberán recogerse muestras patrón de las aves centinela; no obstante, en caso de que dichos resultados sean satisfactorios, deberán recogerse las muestras siguientes de:
 - aves de corral u otras aves cautivas vacunadas: al menos 20 hisopos traqueales/bucofaríngeos, 20 hisopos de cloaca y 20 muestras de sangre para utilizar un ensayo DIVA durante las 72 horas anteriores a la hora de salida, y
 - aves centinela: 20 hisopos traqueales/bucofaríngeos, 20 hisopos de cloaca y 20 muestras de sangre para serología mediante la prueba de IH antes de la hora de salida.

CAPÍTULO V

Pruebas de diagnóstico virológico y evaluación de los resultados

1. Hasta el descubrimiento y el desarrollo de las pruebas moleculares, se consideraba que el aislamiento de virus por inoculación de huevos embrionados de aves de corral era, con mucho, la prueba de diagnóstico más sensible para la gripe aviar y que era esencial para la identificación y la caracterización subsiguientes del virus infeccioso. En el presente capítulo se exponen las fases fundamentales.
2. **Tratamiento de las muestras**

Si los hisopos se presentan «secos», deberán ser colocados en un medio antibiótico suficiente para garantizar su inmersión completa. Las muestras podrán agruparse por lotes de cinco a condición de que deriven de las mismas especies y de la misma unidad epidemiológica y hayan sido tomadas al mismo tiempo.

Los cadáveres presentados en el laboratorio deberán someterse a un examen *post mortem* y deberán recogerse muestras de los órganos siguientes: heces o contenido intestinal, tejido cerebral, tráquea, pulmones, hígado, bazo y otros órganos afectados de manera obvia. Dichos órganos y tejidos podrán agruparse, pero es esencial tratar por separado la materia fecal.

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 % p/v.

Los hisopos sumergidos y las suspensiones deberán dejarse aproximadamente dos horas a temperatura ambiente (o más tiempo a 4 °C) y, a continuación, deberán aclararse mediante centrifugación (por ejemplo, 800 a 1 000 x g durante 10 minutos).

3. Aislamiento del virus en huevos embrionados de aves de corral

Deberá inocularse una cantidad de entre 0,1 y 0,2 ml de líquido sobrenadante aclarado en la cavidad alantoidea de al menos cuatro huevos embrionados de aves de corral que hayan sido incubados entre 9 y 11 días. Lo ideal es que dichos huevos se obtengan de una manada exenta de patógenos específicos, pero cuando esto no sea factible podrán utilizarse huevos procedentes de una manada que haya sido declarada exenta de anticuerpos de la gripe aviar (seronegativos).

Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37 °C y se examinarán al trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos, a medida que se vayan comprobando, al igual que los demás huevos seis días después de la inoculación, serán refrigerados a 4 °C y se comprobará la actividad de hemaglutinación de los líquidos alantoideo y amniótico. Si no se detecta ninguna hemaglutinación, deberá repetirse el procedimiento utilizando líquido alantoideo o amniótico sin diluir como inóculo. Cuando la hemaglutinación sea positiva, debe descartarse la posible presencia de bacterias mediante la realización de un cultivo. En caso de que haya bacterias, los líquidos pueden pasarse a través de un filtro de membrana de 450 nm, añadirse otros antibióticos e inocularse en huevos embrionados según lo indicado anteriormente.

Para acelerar el diagnóstico, algunos laboratorios han realizado dos pases de tres días o un pase de dos más otro de cuatro días, y han notificado resultados comparables a dos pases de seis días, pero esto aún no se ha evaluado plenamente.

Deberá comprobarse si los líquidos positivos están libres de bacterias. En caso de que haya bacterias, los líquidos podrán pasarse a través de un filtro de membrana de 450 nm o centrifugarse para eliminar bacterias y volverse a inocular en los huevos después de haber añadido más antibióticos.

4. Diagnóstico diferencial

a) Diferenciación preliminar

Dada la importancia de que se apliquen cuanto antes las medidas de lucha destinadas a limitar la propagación del virus de la gripe aviar, todos los laboratorios nacionales de referencia que hayan aislado un virus hemaglutinante deberán estar en condiciones de determinar si se trata de un virus de la gripe A de subtipo H5 o H7, o de un virus de la enfermedad de Newcastle. Los líquidos hemaglutinantes deberán utilizarse en pruebas de inhibición de la hemaglutinación, tal y como se describe en el capítulo IX. Una inhibición positiva, por ejemplo, un valor de control positivo dentro de los límites 2-3 log₂, con antiseros policlonales específicos para los subtipos H5 o H7 de la gripe de tipo A, puede servir como identificación preliminar que permita establecer medidas de lucha provisionales.

b) Confirmación de la identificación

Puesto que hay 16 subtipos de hemaglutinina y 9 subtipos de neuraminidasa de virus de la gripe y se producen variaciones dentro de cada uno de ellos, no es factible ni rentable que todos los laboratorios nacionales de referencia conserven antiseros que permitan una plena identificación de los subtipos de las cepas clínicas de la gripe. Sin embargo, como mínimo, cada laboratorio nacional de referencia deberá:

- i) confirmar que la cepa clínica es un virus de la gripe A, mediante una prueba de inmunodifusión doble para determinar los antígenos de grupo,
- ii) determinar si la cepa clínica es o no es de los subtipos H5 o H7; en caso de identificación positiva, es necesario aplicar las medidas de lucha correspondiente a los subtipos H5 y H7 de la gripe aviar de baja patogenicidad,
- iii) presentar inmediatamente todas las cepas clínicas de los subtipos H5 y H7 de la gripe aviar de alta patogenicidad al laboratorio comunitario de referencia para la confirmación y la caracterización completa, a menos que se conceda una excepción de conformidad con la letra d).

Además, en los laboratorios que cuenten con las instalaciones apropiadas, conviene:

- iv) realizar una prueba del índice de patogenicidad intravenosa en pollos de seis semanas de edad, como se establece en el capítulo VII. Unos índices de patogenicidad intravenosa superiores a 1,2 indican la presencia de virus que requieren la plena aplicación de las medidas de lucha contra la gripe aviar de alta patogenicidad.

Los laboratorios nacionales de referencia también deberán pensar en adquirir los conocimientos especializados y el equipo que permitan que la secuencia de nucleótidos del gen de la hemaglutinina determine si hay o no hay múltiples aminoácidos básicos en el sitio de división de la proteína precursora de la hemaglutinina para cualquier virus H5 o H7 de la gripe aviar de baja patogenicidad. Si bien el laboratorio comunitario de referencia determinará la patogenicidad de forma muy prioritaria, como parte de las tareas mencionadas en el anexo VII, punto 2, letra b), de la Directiva 2005/94/CE, tal caracterización de los virus a nivel nacional reducirá considerablemente el tiempo dedicado al diagnóstico y, en caso de ser positivo, para la plena aplicación de las medidas de control de la gripe aviar de alta patogenicidad.

c) Tipificación y caracterización adicionales de las cepas clínicas

Los laboratorios nacionales de referencia enviarán al laboratorio comunitario de referencia todos los virus hemaglutinantes y este, en consonancia con las funciones y tareas que le han sido asignadas y se exponen en el anexo VII de la Directiva 2005/94/CE, 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 dichas funciones y tareas, el laboratorio comunitario de referencia deberá llevar a cabo una tipificación antigénica completa de todos los virus de la gripe que haya recibido. En el caso de los virus H5 y H7 que no tengan índices de patogenicidad intravenosa superiores a 1,2, la secuenciación de nucleótidos del gen de hemaglutinina para determinar si hay o no hay múltiples aminoácidos básicos en el sitio de división de la proteína precursora de la hemaglutinina también deberán realizarse inmediatamente, y el laboratorio nacional de referencia y la autoridad competente del país de origen deberán ser informados tan pronto como se disponga de los resultados a fin de aplicar plenamente las medidas de lucha contra la gripe aviar de alta patogenicidad.

d) Dada la evolución epidemiológica en relación con la gripe aviar de alta patogenicidad y la gripe aviar de baja patogenicidad, cabe la posibilidad de que la Comisión y el laboratorio comunitario de referencia lleguen a un acuerdo para que se conceda una excepción a los laboratorios plenamente capacitados para la caracterización rápida de los virus de presentar un subconjunto de dichos virus, previa inspección de los datos, para que el laboratorio comunitario de referencia haga la selección pertinente. Solo se permitirá tal excepción en caso de que el laboratorio nacional de referencia pueda generar rápidamente los datos y los comparta con el laboratorio comunitario de referencia.

CAPÍTULO VI

Pruebas moleculares y evaluación de los resultados

La definición actual de gripe aviar de alta patogenicidad permite la identificación molecular de factores de virulencia y confirma el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de la gripe aviar. Últimamente se han registrado avances en su aplicación para la detección y la caracterización del virus de la gripe aviar directamente a partir de muestras clínicas de aves infectadas. Las técnicas convencionales de RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) en muestras clínicas podrían, con un cebador bien definido, dar como resultado una detección y una identificación rápidas del subtipo (por lo menos de los subtipos H5 y H7), además de un amplicón de la RCP que podría utilizarse para la secuenciación de nucleótidos, y se ha demostrado que dichas técnicas son muy útiles para identificar rápidamente los focos subsiguientes una vez que se han detectado las primeras instalaciones infectadas y se ha caracterizado el virus. La RCP-TR de fase única en «tiempo real» que utiliza sistemas de sonda cebador/fluorogénica (RCP-TRr) permiten un diagnóstico aún más rápido y sensible, al detectar los virus de la gripe aviar y determinar el subtipo H5 o H7 en las muestras clínicas.

Un problema importante que se presenta con los sistemas RCP-TR y RCP-TRr es que, hasta la fecha, varios laboratorios han desarrollado sistemas distintos, que, aunque son perfectamente legítimos, no han sido validados ni sometidos a pruebas con un número importante de muestras en laboratorios diferentes. El laboratorio comunitario de referencia y los laboratorios nacionales de referencia especificados han abordado este problema como parte de un proyecto financiado por la Comunidad (EU AVIFLU) para presentar protocolos ratificados de RCP-TR y RCP-TRr convencionales que puedan ser adoptados por otros laboratorios nacionales de referencia. Si los parámetros de prueba, como los tiempos de ciclo y de rampa, difieren de los recomendados en los protocolos especificados, deberá demostrarse que se ajustan a su propósito antes de ser utilizados de conformidad con el capítulo I, punto 6, del presente manual de diagnóstico.

En el siguiente sitio web pueden consultarse los protocolos normalizados de dichas pruebas moleculares y su evaluación según lo aplicado por el laboratorio comunitario de referencia:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

CAPÍTULO VII

Prueba de patogenicidad in vivo y evaluación de los resultados

La virulencia de los virus de la gripe de tipo A aislados de origen aviar deberá calcularse utilizando la prueba del índice de patogenicidad intravenosa (IPIV), que deberá realizarse como sigue:

- diluir 1/10 de líquido alantoideo infeccioso fresco con un valor de hemaglutinación $> 1/16$ ($> 2^4$ o $> \log_2 4$ cuando se expresa como el inverso) del pase más bajo posible, preferentemente del aislamiento inicial y sin selección alguna en una disolución salina isotónica estéril;
- inyectar 0,1 ml del virus diluido por vía intravenosa en cada uno de los 10 pollos de seis semanas de edad sin gérmenes patógenos específicos o seronegativos;

- c) examinar cada ave cada 24 horas durante 10 días. En cada observación, anotar un 0 si su estado es normal, un 1 si está enferma, un 2 si está gravemente enferma, y un 3 si está muerta. El criterio de qué aves están enfermas y cuáles están gravemente enfermas es un diagnóstico clínico subjetivo.

Normalmente, las aves «enfermas» muestran uno de los signos siguientes y las «gravemente enfermas» más de uno de los signos siguientes: problemas respiratorios, depresión, diarrea, cianosis en la piel no recubierta o en las barbas, edema en la cara o en la cabeza o signos nerviosos. Debe anotarse un 3 por cada ave muerta en cada una de las observaciones diarias que queden una vez que se haya producido la muerte.

Por motivos de bienestar, cuando las aves estén demasiado enfermas para comer o beber deberán ser sacrificadas compasivamente y se anotarán como muertas en la siguiente observación, ya que morirán en un plazo de 24 horas sin intervención alguna. Este planteamiento es aceptable para los organismos de acreditación;

- d) el índice de patogenicidad intravenosa es la puntuación media por ave y por observación durante el período de 10 días. Un índice de 3,00 significa que todas las aves murieron en 24 horas y un índice de 0,00 significa que ninguna ave mostró ningún signo clínico durante el período de observación de 10 días.

En el ejemplo siguiente se expone un método simple para registrar los resultados y calcular los índices:

Signos clínicos	Días después de la inoculación										Puntuación total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
Enferma	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Gravemente enferma	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Muerta	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											Total = 246

Notas:

10 aves observadas durante 10 días = 100 observaciones

Índice = puntuación media por ave y por observación = $246/100 = 2,46$

Se considera que cualquier virus de la gripe de tipo A, independientemente del subtipo, que dé un valor superior a 1,2 en una prueba del índice de patogenicidad intravenosa es un virus de la gripe aviar de alta patogenicidad.

CAPÍTULO VIII

Pruebas serológicas y evaluación de los resultados

El método preferido para determinar la presencia del virus de la gripe A es demostrar la existencia de antígenos de la nucleoproteína o de la matriz, que se hallan presentes en todos los virus de la gripe de tipo A.

Tal demostración puede realizarse mediante pruebas de inmunodifusión doble, para las que se necesitan preparados de virus concentrados o extractos de membranas corioalantoideas infectadas.

Los métodos preferidos utilizados para las pruebas serológicas destinadas a detectar anticuerpos de virus de la gripe aviar son la hemaglutinación (HA) y las pruebas de inhibición de hemaglutinación (IH).

El capítulo 2.7.12 del Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) contiene información detallada sobre las técnicas de laboratorio y la evaluación de los resultados.

Pueden consultarse los protocolos normalizados para las pruebas serológicas y la evaluación de sus resultados según lo aplicado por el laboratorio comunitario de referencia en el sitio web siguiente:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

CAPÍTULO IX

Sistemas de seguimiento asociados a la vacunación

1. La Directiva 2005/94/CE y el manual de diagnóstico

Las secciones 2 y 3 del capítulo IX de la Directiva 2005/94/CE admiten la vacunación de urgencia y la vacunación preventiva en determinadas condiciones. Una de esas condiciones es que se utilice una estrategia «DIVA» (diferenciación de los animales infectados y de los animales vacunados).

El objetivo de la vacunación será evitar la infección y la propagación subsiguiente del virus entre manadas diferentes. Existen pruebas irrefutables que demuestran que la vacunación aumenta la cantidad de virus necesaria para infectar aves y disminuye la cantidad de virus excretada. No obstante, aunque las aves vacunadas dejen de desarrollar signos clínicos, pueden seguir propagando el virus cuando se las somete a una infección artificial. Por tanto, los virus de la gripe aviar de alta patogenicidad de los subtipos H5 y H7 podrían circular inadvertidamente durante algún tiempo en una manada que se encuentre por debajo del nivel óptimo de inmunidad del mismo modo que los virus de la gripe aviar de baja patogenicidad podrían hacerlo en una manada sin vacunar. Por tanto, es necesario poder identificar las manadas vacunadas positivas al virus que hayan sido infectadas por el virus de campo para poder aplicar otras medidas de lucha, como medidas de sacrificio masivo.

2. Utilización de aves centinela para el seguimiento de la infección

Dentro de las manadas, un método sencillo es hacer un seguimiento periódico de las aves centinela que se han dejado sin vacunar en cada manada vacunada, pero este planteamiento presenta algunos problemas de gestión, sobre todo a la hora de identificar las aves centinela en grandes manadas. Deberá garantizarse el contacto entre las aves centinela y las aves vacunadas.

3. Prueba de laboratorio DIVA para el seguimiento de la infección

Como alternativa o por añadidura, podrán realizarse pruebas de exposición de campo en las propias aves vacunadas mediante pruebas de laboratorio DIVA. En los últimos años se han desarrollado varios sistemas de prueba que permiten, asimismo, percibir la infección artificial de campo de las aves vacunadas. Un método que ha demostrado ser factible es el uso de una vacuna que contenga un virus del mismo subtipo de hemaglutinina (H), pero una neuraminidasa (N) diferente del virus de campo predominante. Los anticuerpos de la N del virus de campo actúan como marcadores naturales de la infección.

Ese sistema se utilizó en Italia tras la reaparición, en 2000, de un virus H7N1 de la gripe aviar de baja patogenicidad. Para complementar las medidas de control directo, se aplicó una estrategia DIVA utilizando una vacuna que contenía un virus H7N3 para combatir una infección de campo producida por un virus H7N1. Se diferenciaron las aves vacunadas de las expuestas al campo mediante una prueba serológica destinada a detectar anticuerpos específicos anti-N1. En 2002-2003 se utilizó en Italia la misma estrategia para controlar la gripe aviar de baja patogenicidad causada por el virus H7N3, en este caso con una vacuna H7N1 y una prueba serológica destinada a detectar específicamente anticuerpos anti-N3. En ambos casos, la vacunación acompañada con el sacrificio utilizando esta estrategia DIVA dio lugar a la erradicación del virus de campo.

Pueden plantearse problemas con ese sistema en caso de que aparezca un virus de campo con el mismo antígeno N que el virus de campo existente, pero de un subtipo H distinto de H5 o H7, o de que los subtipos con los mismos antígenos N ya circulen en el campo. Se sabe que, en particular, los patos son portadores de más de un subtipo. Además, era necesario desarrollar una prueba adecuada que permitiera el seguimiento rutinario de las manadas para detectar anticuerpos de antineuraminidasa. En Italia se desarrolló y utilizó una prueba serológica *ad hoc* basada en un análisis de anticuerpos fluorescentes indirectos, utilizando como antígeno N proteínas expresadas mediante baculovirus recombinantes, lo cual podrá aplicarse más ampliamente y con mayor facilidad cuando se desarrolle una prueba ELISA.

El uso de vacunas que contengan solo HA, como las vacunas vectoriales recombinadas, permite utilizar las pruebas clásicas de inmunodifusión en agar o las pruebas ELISA basadas en la nucleoproteína, la proteína no estructural o las proteínas de la matriz para detectar la infección en las aves vacunadas.

En el caso de las vacunas inactivadas, se ha descrito una prueba que detecta los anticuerpos de la proteína no estructural del virus que solamente se producen durante una infección natural. Aún debe validarse dicho sistema sobre el terreno, pero tiene la limitación de que la infección natural de una manada con cualquier virus de la gripe, sea cual sea su subtipo, da lugar a la producción de anticuerpos dirigidos contra la proteína no estructural.

El desarrollo de métodos rápidos y sensibles para la detección de virus, especialmente aquellos que pueden automatizarse, como la RCP-TR en tiempo real, significa que estos podrían utilizarse para realizar pruebas amplias y periódicas en aves vacunadas para comprobar si existen virus de campo. Sin embargo, la detección del agente se limitará a un breve intervalo en la fase aguda de la infección y no podrá servir para inferir que una manada no ha estado expuesta al virus en el pasado. Este planteamiento es más apropiado para la realización de pruebas en aves vacunadas antes de su desplazamiento, a fin de demostrar que están exentas de infecciones activas.

El número de muestras que deberán ser probadas por los sistemas elegidos deberá permitir que quede excluida una prevalencia superior al 15 % de la infección del virus de la gripe aviar en una manada, con un nivel de fiabilidad del 95 %.

CAPÍTULO X

Estrategias de diagnóstico de la gripe aviar

Según lo establecido en el anexo IV de la Directiva 2005/94/CE, las decisiones de aplicar medidas en zonas o explotaciones de contacto específicas y la gravedad de las mismas pueden variar notablemente en función de la gravedad del riesgo. Del mismo modo, es probable que la confirmación requerida del diagnóstico de la enfermedad se contraste con la situación predominante, la gravedad del peligro y el nivel de riesgo. Las autoridades veterinarias tienen que tomar decisiones sobre las pruebas de diagnóstico que pongan el control y la erradicación precoces de la enfermedad en relación con el impacto que pueda tener un diagnóstico equivocado. Tales decisiones deben tomarse en un contexto en el que confluyen numerosos factores a la vez, pero pueden predecirse determinadas situaciones.

Situación de la enfermedad	Posible problema	Criterios de diagnóstico
Signos no específicos, ninguna sospecha oficial	Explotación aislada	Realizar una detección rápida basada en la RPC-TR del gen M. Diagnóstico diferencial en caso de necesidad.
Sospecha de foco primario	Explotación aislada	Realizar pruebas de diagnóstico completas, así como el aislamiento y la caracterización del virus.
Sospecha de foco primario	Explotación en una zona con gran densidad de población de aves de corral	Realizar las pruebas de diagnóstico completas, así como el aislamiento y la caracterización del virus, y centrarse en los métodos rápidos de detección y caracterización, especialmente en los basados en la RCP-TR y la secuenciación ⁽¹⁾ .
Segunda sospecha de foco y sospechas subsiguientes	Explotaciones aisladas, relacionadas epidemiológicamente con la sospecha de foco primario	Centrarse en los métodos rápidos de detección y caracterización, especialmente en los basados en la RPC-TR y la secuenciación ⁽¹⁾ .
Segunda sospecha de foco y sospechas subsiguientes	Explotaciones en zonas con gran densidad de aves de corral o con muchas relaciones epidemiológicas	Basarse en métodos rápidos de detección que permitan obtener cuanto antes pruebas de la presencia de cualquier virus de gripe aviar ⁽¹⁾ .
Sospechas de focos múltiples o propagación rápida de la enfermedad, incluida la vigilancia.	La propagación llegará a ser incontrolable si no se interviene con rapidez	Basarse en métodos de detección rápidos que permitan obtener cuanto antes pruebas de la presencia de cualquier virus de gripe aviar o basarse en los signos clínicos ⁽¹⁾ .

(1) En estos casos, debe realizarse un muestreo completo y deben conservarse muestras para su evaluación posterior.

CAPÍTULO XI

Diagnóstico de la infección por virus de la gripe aviar en cerdos y otros mamíferos**1. La gripe aviar en los cerdos**

Los virus de la gripe aviar infectan fácilmente a los cerdos y, si bien en la mayoría de los casos su reproducción está relativamente restringida, existe la posibilidad de que los cerdos infectados transmitan la enfermedad a aves de corral u otros animales sensibles. Hasta la fecha no hay pruebas sobre el terreno de que los cerdos infectados transmitan virus de la gripe aviar de los subtipos H5 y H7.

La experiencia adquirida a raíz del foco detectado en los Países Bajos en 2003 indicó que los cerdos infectados por el virus H7N7 no mostraron ningún signo clínico que pudiera atribuirse a la infección de H7N7. Por otra parte, al parecer hasta ahora no hay constancia de que haya aparecido ningún cerdo enfermo durante el foco de H5N1 en Asia ni en ninguna otra parte.

Por tanto, no se puede confiar en los signos clínicos para determinar si los cerdos están infectados, aunque estos puedan presentarse, debido a la infección de cerdos por otros virus de la gripe de origen aviar, una vez que un virus se haya adaptado al hospedador. El diagnóstico de infecciones de cerdos por el virus de la gripe aviar es esencialmente parecido al diagnóstico para las especies de aves, y se basa en el aislamiento de los virus, las técnicas moleculares y la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación. Sin embargo, existen algunas diferencias y ninguna de las pruebas está plenamente validada de tal manera que su uso en cerdos sirva para confirmar la infección por virus de la gripe aviar.

2. Muestras para el aislamiento de virus

En general, las infecciones por virus de la gripe aviar en cerdos se restringen a las vías respiratorias, y las muestras deberán consistir en tejidos del aparato respiratorio y, si procede, en hisopos bucofaríngeos o nasales, preferentemente recogidos de cerdos que presenten signos de esa enfermedad. Dichas muestras e hisopos podrán tratarse para el aislamiento del virus o para la detección molecular del mismo, utilizando las técnicas descritas anteriormente para muestras procedentes de aves. Sin embargo, al utilizar técnicas de la RCP, deberán utilizarse controles apropiados para garantizar que la amplificación no es inhibida por sustancias presentes en las muestras procedentes de cerdos.

3. Inoculación e incubación de huevos

Para aislar los virus de la gripe de mamíferos en huevos de aves de corral embrionados de entre nueve y once días, la inoculación de cada huevo a través de la cavidad alantoidea y en la cavidad amniótica constituye una práctica habitual. Sin embargo, cuando se realizan pruebas en cerdos que han estado en contacto con virus de la gripe aviar y el virus ha tenido pocas oportunidades de adaptarse, es probable que baste con la inoculación en la cavidad alantoidea.

Del mismo modo, normalmente se recomienda una temperatura de incubación de 35 °C para el aislamiento de virus de la gripe de tipo A en mamíferos, si bien, en el caso de los virus que se adaptan mal a los cerdos, una temperatura de 37 °C no debe perjudicar el aislamiento del virus.

4. Prueba de anticuerpos específicos en pruebas de IH

Es probable que el aislamiento del virus o la detección molecular sean los métodos más sensibles para determinar infecciones de cerdos por el virus de la gripe aviar. No obstante, se han detectado respuestas serológicas de cerdos sin haber aislado o detectado el virus. Las pruebas de IH mediante sueros de cerdo requiere que se realicen algunas modificaciones respecto a la prueba utilizada para los sueros aviares mencionados en el capítulo VIII.

Es bien conocida la propiedad de los sueros porcinos de inhibición no específica en las pruebas de IH y, por tanto, cada muestra de suero deberá tratarse con una enzima destructora de receptores (RDE) para evitar que esto ocurra. Deberá utilizarse el método siguiente:

- a) añadir 400 µl de RDE (dilución de trabajo predeterminada) a 100 µl de antisuero de cerdo y mezclar completamente;
- b) incubar a 37 °C durante una hora;
- c) a continuación, incubar durante 30 minutos a 56 °C;
- d) enfriar las muestras a 4 °C durante 15 minutos como mínimo;
- e) añadir 10 µl de una suspensión de hematíes de pollito al 30 % (valor de hematocrito) y mezclar enérgicamente;
- f) incubar a 4 °C durante toda la noche. En caso de que sea esencial utilizar las muestras ese mismo día, incubar a 37 °C durante una hora y centrifugar a 300 × g durante cinco minutos.

El suero tratado se utiliza a continuación en pruebas de IH con arreglo a lo dispuesto para los sueros aviares en el apartado [...], la dilución inicial será de 1:10. Deberá utilizarse un conjunto de sueros de cerdos con una situación seronegativa conocida respecto a la gripe aviar a fin de evaluar la especificidad de la prueba de IH respecto a la cepa vírica que vaya a utilizarse (véase el uso de la cepa vírica derivada del foco para las pruebas serológicas; capítulo VIII). Durante el foco aparecido en los Países Bajos en 2003, se detectó hasta un 2,6 % de reactores no específicos en la prueba de IH realizada con sueros de cerdo recogidos al margen del foco.

5. Muestreo de los cerdos

En particular, en las explotaciones agrícolas donde permanecen tanto cerdos como aves de corral, ya sea mezclados o en recintos separados, los cerdos corren riesgo de infectarse por gripe aviar directa o indirectamente por contacto con aves de corral o productos de las mismas. Para excluir tal infección, deberán recogerse hisopos bucofaríngeos o nasales y muestras de sangre con arreglo a los procedimientos descritos en el punto 8.21 del capítulo IV. Las muestras deberán obtenerse de cerdos que muestren signos clínicos de la enfermedad. No obstante, en caso de que no muestren ningún signo clínico, las muestras podrán recogerse al azar en todas las secciones de la explotación. Si el laboratorio dispone de ellos, los hisopos deberán probarse mediante pruebas moleculares rápidas y/o aislamiento de virus. La RCP-TR deberá haberse validado adecuadamente y tener una sensibilidad como mínimo equivalente al aislamiento del virus en huevos respecto a los virus de la gripe de tipo A.

Entre dos y cuatro semanas después del sacrificio de las aves de corral infectadas por gripe aviar, deberán recogerse al menos 60 muestras de los cerdos, de manera que al menos algunas muestras se recojan de grupos de cerdos que estén en contacto directo entre sí. Las muestras deberán probarse en una prueba de IH que utilice el virus derivado del foco de las aves de corral. Las muestras tanto de la fase aguda como de la fase convaleciente deberán probarse en la misma prueba. Las muestras positivas pueden confirmarse mediante la neutralización de virus y/o análisis de *Western blot*.

Si cualquiera de esas muestras da un resultado positivo, deberá efectuarse una investigación epidemiológica en todas las explotaciones porcinas situadas en la zona de protección, tanto si se trata de explotaciones mixtas como si no.

6. Virus de la gripe aviar en mamíferos distintos de los cerdos

Deberán efectuarse investigaciones en mamíferos distintos de los cerdos que sean sensibles a la gripe aviar, incluidos los gatos. Por lo que se refiere a la gripe aviar de alta patogenicidad H5N1, deberá realizarse lo siguiente cuando se realicen pruebas en gatos:

Las lesiones patológicas graves, asociadas a la replicación vírica, se concentran en los pulmones y el hígado, por lo que las muestras para las investigaciones virológicas deberán recogerse preferentemente de estos órganos de animales muertos. En los animales vivos, deberán recogerse preferentemente hisopos traqueales/bucofaríngeos para la detección de virus. Asimismo, pueden obtenerse hisopos fecales por separado.

Las muestras de sangre destinadas a ser examinadas en ensayos de IH requerirán un tratamiento térmico a 56 °C durante 30 minutos y se podrá prescindir del tratamiento RDE.

CAPÍTULO XII

Requisitos mínimos de seguridad para el transporte de las muestras

1. El transporte de muestras en las que conste la presencia de patógenos o cuya presencia se sospeche serán objeto de estrictas normativas nacionales e internacionales que deberán respetarse en todo momento. Las cepas aisladas del virus no están clasificadas como muestras de diagnóstico, sino que deberán embalarse conforme a las normas internacionales.

Las instrucciones expuestas en el presente capítulo se refieren al transporte aéreo, pero deberá utilizarse un embalaje similar para el transporte terrestre o marítimo de las muestras.

2. Embalaje de las muestras de diagnóstico para su transporte

Las muestras para diagnóstico transportadas conforme a las normas de la IATA se asignarán al número de identificación de la ONU 2814, 2900, o 3373, según corresponda.

El expedidor, y no la empresa de transporte, es responsable del envío hasta que el paquete alcance al destinatario.

3. Embalaje primario

- a) El recipiente o recipientes primarios deberán ser estancos, por ejemplo, los tapones de rosca deberán sellarse con parafilm, cinta adhesiva o protecciones similares.
- b) Cuando haya varios recipientes primarios, estos deberán envolverse individualmente para evitar cualquier rotura.
- c) Al determinar el volumen de las muestras para diagnóstico enviadas, deberán tenerse en cuenta los medios de transporte vírico.
- d) El o los recipientes primarios no deberán contener más de 500 ml o 500 g.

Todo el contenido del recipiente primario constituye la muestra para diagnóstico.

4. Embalaje secundario

- a) En el envase secundario deberá utilizarse el suficiente material absorbente para absorber todo el contenido de los recipientes primarios en caso de fuga o deterioro.
- b) El embalaje secundario deberá cumplir los requisitos de envase de la IATA para las muestras de diagnóstico, incluido el procedimiento para el ensayo de caída desde 1,2 metros (3,9 pies) de altura. Puesto que el embalaje de sustancias infecciosas supera los requisitos para el embalaje de muestras de diagnóstico de la Instrucción de embalaje de la IATA 602, podrá utilizarse dicho embalaje.

- c) El embalaje de sustancias infecciosas deberá presentar los marcados de especificación exigidos («UN» irá dentro de un círculo); por ejemplo:

«UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450»

- d) El embalaje secundario deberá ser estanco. Deberán respetarse las instrucciones del fabricante del embalaje o de cualquier otra parte autorizada que estén incluidas en el embalaje secundario.
- e) La dimensión externa global del embalaje secundario deberá ser, como mínimo, de 100 mm (cuatro pulgadas).
- f) El embalaje secundario deberá ser lo suficientemente amplio para poder enviar documentos, como un documento de transporte aéreo.

5. Embalaje externo

- a) El embalaje externo no deberá contener más de 4 l o de 4 kg.
- b) En caso necesario, deberá colocarse hielo seco o húmedo fuera del embalaje secundario. Si se utiliza hielo seco, el embalaje deberá permitir liberar gas de dióxido de carbono y no deberá permitir un aumento de la presión que pudiera romper el embalaje. Si se utiliza hielo húmedo, el embalaje deberá ser hermético.

Cada paquete y el documento de transporte aéreo deberán marcarse literalmente con la siguiente redacción:

**«UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650»**

- c) Deberá adjuntarse una lista detallada del contenido entre el embalaje secundario y el embalaje externo.
- d) El embalaje externo deberá colocarse en una bolsa de plástico sellada para protegerlo de la humedad.
- e) No se exigirá al expedidor una Declaración de mercancías peligrosas.

CAPÍTULO XIII

Envío de virus y muestras al laboratorio comunitario de referencia

1. Las muestras que se envíen al laboratorio comunitario de referencia han de cumplir las recomendaciones para el transporte de patógenos peligrosos en la Comunidad, así como la normativa y la legislación vigentes en el Reino Unido.

Deberán seguirse las instrucciones que se exponen en el presente capítulo.

2. Envío de virus u otros materiales al laboratorio comunitario de referencia

- a) Todos los materiales deberán embalsarse conforme a las instrucciones que figuran en el presente capítulo.
- b) El embalaje externo deberá marcarse como sigue:

«ANIMAL PATHOGEN — PACKAGE ONLY TO BE OPENED AT THE AVIAN VIROLOGY SECTION, VLA, WEYBRIDGE. IMPORTATION AUTHORISED BY LICENCE NUMBER ...*... ISSUED UNDER THE IMPORTATION OF ANIMAL PATHOGENS ORDER.» «Patógeno animal — El embalaje deberá abrirse únicamente en la Sección de virología aviar, VLA, Weybridge. Importación autorizada con nº de licencia ...*... expedida conforme a la orden relativa a la importación de patógenos animales.»

- c) Se deberá introducir uno de los siguientes números de licencia:

- i) para los virus de la gripe aviar: «AHZ/2232/2002/5*»,
- ii) para los tejidos y otros materiales: «AHZ/2074C/2004/3*».

Dado que dichos números de licencia se modifican de vez en cuando, los laboratorios que envíen muestras deberán asegurarse de que utilizan los números de licencia actualizados antes de enviar los paquetes.

d) El paquete deberá dirigirse a la siguiente dirección:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
United Kingdom

e) El paquete deberá ir acompañado de una carta con toda la información posible sobre las cepas clínicas, como su especie y su edad, la zona o el país de aislamiento y todo el historial clínico.

f) Los paquetes deberán enviarse por correo o flete aéreo.

Si los paquetes se envían mediante flete aéreo, antes de que el material llegue al laboratorio comunitario de referencia deberá facilitarse a este el número de identificación del vuelo por fax, teléfono o correo electrónico.

Los paquetes enviados por flete aéreo deberán marcarse claramente como sigue:

«**CARE OF TRANSGLOBAL**» a fin de garantizar una tramitación rápida en el aeropuerto.

Contactos con el laboratorio comunitario de referencia:

Ian H. BROWN, Director del laboratorio de referencia
Tel. directo: (44-1932) 35 73 39;
Fax directo: (44-1932) 35 72 39;
Correo electrónico: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth MANVELL, Gerente del laboratorio de referencia
Tel. directo: (44-1932) 35 77 36 o (44-1932) 35 77 08
Fax directo: (44-1932) 35 78 56
Correo electrónico: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

CAPÍTULO XIV

Requisitos mínimos de seguridad para un laboratorio de diagnóstico de la gripe aviar

1. Los requisitos de seguridad de los laboratorios de diagnóstico que trabajen con virus de la gripe aviar deberán prever la contención de los virus como amenaza zoonosaria y la protección de las personas que trabajen en el laboratorio (y fuera de él) contra cualquier riesgo zoonótico.

Dentro de la Comunidad, los requisitos mínimos en materia de seguridad para los laboratorios se establecen en varias Directivas. Además, los aspectos operativos se describen y se establecen en las normas europeas que las sustentan (EN). Existen otras reglamentaciones (EN) para el funcionamiento de los laboratorios a efectos de diagnóstico, como las buenas prácticas de laboratorio.

2. Directivas de la Comunidad relativas a los laboratorios

Directiva 89/391/CEE del Consejo, de 12 de junio de 1989, relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y de la salud de los trabajadores en el trabajo (DO L 183 de 29.6.1989, p. 1).

Directiva 90/679/CEE del Consejo, de 26 de noviembre de 1990, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE) (DO L 374 de 31.12.1990, p. 1).

En caso de que haya un diagnóstico realizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y clonación de productos de la RCP en un plásmido bacteriano de propagación, por ejemplo, a efectos de la secuenciación del ADN, además de esas dos Directivas se aplican la Directiva y las normas europeas (EN) siguientes:

Directiva 90/219/CEE del Consejo, de 23 de abril de 1990, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente (DO L 117 de 8.5.1990, p. 1).

3. Además de las Directivas de la Comunidad, deberán reconocerse las normas europeas (EN):

EN 12128 Biotecnología. Laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. Niveles de contención de los laboratorios de microbiología, zonas de riesgo, instalaciones y requisitos físicos de seguridad.

EN 12738 Biotecnología. Laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. Guía para la contención de los animales inoculados con microorganismos con fines experimentales.

EN 12740 Biotecnología. Laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. Guía para la manipulación, inactivación y ensayo de residuos.

EN 12741 Biotecnología. Laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. Guía para las operaciones en los laboratorios biotecnológicos.

Para dirigir un laboratorio se aplicarán las condiciones siguientes:

4. Requisitos para los laboratorios (niveles de contención 1 a 4)

De conformidad con la **Directiva 2000/54/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE) (DO L 262 de 17.10.2000, p. 21), Directiva 90/219/CEE y normas europeas: EN 12128; EN 12740; EN 12741.

Medidas de contención	Grado de contención			
	1	2	3	4
Dependencias del laboratorio: aislamiento	no	sí	sí	sí
Laboratorios separados por puertas	no	sí	sí	sí
Una ventana de observación o similar para poder ver a los ocupantes	opcional	opcional	opcional	sí
El personal deberá disponer de instalaciones para lavarse las manos	sí	sí	sí	sí
Deberán facilitarse instalaciones para la desinfección de las manos	opcional	sí	sí	sí
Acceso restringido	no	sí	sí	sí
Medidas específicas para el control de los aerosoles	no	sí: minimizar	sí: evitar	sí: evitar
Señalización de peligro biológico en la puerta	no	sí	sí	sí
Ducha	no	no	opcional	sí
Irrigación ocular	sí	sí	sí	sí
Laboratorio: hermético para realizar una fumigación	no	no	sí	sí
Superficies resistentes al agua, los ácidos, los álcalis, los disolventes, los desinfectantes y los agentes descontaminantes, y que sean fáciles de limpiar	sí (mesa)	sí (mesa)	sí (mesa y suelo)	sí (mesa y suelo)
Acceso al laboratorio a través de una cámara estanca	no	no	opcional	sí
Presión negativa respecto a la presión del entorno inmediato	no	no	opcional	sí
Aire de entrada y salida del laboratorio tratado con filtros HEPA	no	no	sí (aire de salida)	sí
Autoclave	in situ	en el edificio	en las dependencias del laboratorio	en el laboratorio, con dos extremos

Medidas de contención	Grado de contención			
	1	2	3	4
Indumentaria de protección	indumentaria de protección adecuada	indumentaria de protección adecuada	indumentaria de protección adecuada (y calzado opcional)	cambio completo de ropa
Guantes	no	opcional	sí	sí
Control eficaz de los vectores (por ejemplo, roedores e insectos)	opcional	sí	sí	sí
Conservación segura de los agentes biológicos	sí	sí	sí	sí
El laboratorio debe tener su propio equipo	no	no	recomendado	sí

Existen otras normas europeas que se refieren a la gestión y la organización de los laboratorios.

Existen otras reglamentaciones y recomendaciones nacionales e internacionales que también deben respetarse. La OMS ha publicado, en su sitio web, la tercera edición de su Manual de bioseguridad en el laboratorio:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5. Contención respecto a la salud animal

La normativa relativa a la contención de los virus de la gripe aviar, en especial de alta patogenicidad, pero con inclusión de todos los virus de la gripe aviar de los subtipos H5 y H7, deberá ser establecida por las autoridades veterinarias de los Estados miembros. En el capítulo 1.4.5 del Código sanitario para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) se facilita cierta orientación, y se considera que la gripe aviar altamente patógena es un patógeno clasificado en el grupo 4 de contención de la OIE.

La normativa que rige la manipulación de los virus de la gripe aviar será aplicada por las autoridades veterinarias del Estado miembro.

Los requisitos mínimos de seguridad aplicados por el laboratorio comunitario de referencia, que son las normas nacionales del Reino Unido, pueden consultarse en el siguiente sitio web:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

6. Contención respecto a la salud humana

Los laboratorios que trabajen con virus de la gripe aviar deberán ser conscientes en todo momento de que dichos virus son, como mínimo, potencialmente patógenos para los seres humanos y gestionarán el laboratorio de manera que se evite infectar a las personas que trabajen en el laboratorio, así como cualquier escape del virus que afecte a las personas que se encuentren fuera del mismo.

En el sitio web de la Organización Mundial de la Salud (OMS) pueden consultarse las orientaciones para manipular muestras sospechosas de contener virus de la gripe aviar de tipo A.

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/