

## II

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

## CONSEJO

## DIRECTIVA 92/40/CEE DEL CONSEJO

de 19 de mayo de 1992

por la que se establecen medidas comunitarias para la lucha contra la influenza aviar

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 43,

Vista la propuesta de la Comisión <sup>(1)</sup>,

Visto el dictamen del Parlamento Europeo <sup>(2)</sup>,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social <sup>(3)</sup>,

Considerando que el sector de las aves de corral figura en el Anexo II del Tratado; que la comercialización de aves de corral constituye una importante fuente de ingresos de la población agraria;

Considerando que, si se presentan brotes de influenza aviar de gran patogenicidad, enfermedad producida por un virus de la influenza de características especiales y que en lo sucesivo se denominará «influenza aviar», es necesario establecer a escala comunitaria medidas de lucha contra la misma con objeto de garantizar el desarrollo nacional del sector de las aves de corral y de contribuir a la protección de la salud animal en la Comunidad;

Considerando que los brotes de influenza aviar pueden adquirir rápidamente un carácter epizootico y provocar una mortalidad y unas perturbaciones tales que comprometan seriamente la rentabilidad de las explotaciones avícolas en su conjunto;

Considerando que es necesario tomar medidas en cuanto existan indicios de esta enfermedad de manera que, si se confirma, sea posible adoptar inmediatamente medidas eficaces de lucha contra la misma;

Considerando que, tan pronto como se declare un brote de esta enfermedad, es necesario impedir su propagación controlando de modo estricto el transporte de animales y la utilización de productos que puedan estar contaminados y, en su caso, recurriendo a la vacunación;

Considerando que el diagnóstico de la enfermedad debe efectuarse bajo los auspicios de los laboratorios nacionales responsables, que deberán estar coordinados por un laboratorio comunitario de referencia;

Considerando que las medidas comunitarias de lucha contra la influenza aviar constituyen la base para el mantenimiento de un nivel uniforme de salud animal;

Considerando que las disposiciones del artículo 3 de la Decisión 90/424/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, relativa a determinados gastos en el ámbito veterinario <sup>(4)</sup> se aplican a la aparición de la influenza aviar;

Considerando que es conveniente encomendar a la Comisión la tarea de adoptar las medidas de aplicación necesarias,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

*Artículo 1*

La presente Directiva establece las medidas comunitarias para la lucha contra la influenza aviar aplicables en caso de que esta enfermedad se declare en aves de corral, sin perjuicio de las disposiciones comunitarias que regulan el comercio intracomunitario.

La presente Directiva no se aplicará en caso de que se detecte la influenza aviar en otras aves. Sin embargo, los Estados miembros deberán informar a la Comisión de las medidas que hayan adoptado.

*Artículo 2*

A efectos de la presente Directiva, se utilizarán como proceda las definiciones del artículo 2 de la Directiva 90/539/CEE del Consejo, de 15 de octubre de 1990, relativa a las

<sup>(1)</sup> DO n° C 231 de 5. 9. 1991, p. 4.

<sup>(2)</sup> DO n° C 326 de 16. 12. 1991, p. 242.

<sup>(3)</sup> DO n° C 79 de 30. 3. 1992, p. 8.

<sup>(4)</sup> DO n° L 224 de 18. 8. 1990, p. 19; Decisión modificada por la Decisión 91/133/CEE (DO n° L 66 de 13. 3. 1991, p. 18).

condiciones de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros <sup>(1)</sup>.

Además, se entenderá por:

- a) *ave de corral infectada*:
- cualquier ave de corral en la que un examen por un laboratorio autorizado haya permitido comprobar oficialmente la influenza aviar tal como se define en el Anexo I, o
  - tratándose de un segundo brote o de brotes subsiguientes, cualquier ave de corral en la que se hayan encontrado signos clínicos o lesiones *post mortem* propios de la influenza aviar;
- b) *ave de corral sospechosa de estar infectada*: toda ave de corral con signos clínicos o lesiones *post mortem* tales que se pueda sospechar justificadamente la presencia de la influenza aviar o en la que se haya comprobado la presencia del subtipo H5 o H7 del virus de la influenza A;
- c) *ave de corral sospechosa de estar contaminada*: toda ave de corral que haya podido estar, directa o indirectamente, en contacto con el virus de la influenza aviar o con el subtipo H5 o H7 del virus de la influenza A;
- d) *autoridad competente*: la autoridad competente con arreglo al punto 6 del artículo 2 de la Directiva 90/425/CEE <sup>(2)</sup>;
- e) *veterinario oficial*: el veterinario designado por la autoridad competente.

#### Artículo 3

Los Estados miembros velarán por que se notifique obligatoria e inmediatamente toda sospecha de influenza aviar a la autoridad competente.

#### Artículo 4

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

2. En cuanto se le notifique la sospecha de infección, la autoridad competente pondrá la explotación bajo vigilancia oficial y ordenará, en particular, que:

- a) se realice un censo de todas las aves de corral de la explotación en el que se precise, por categorías, el número de aves de corral muertas, cuántas presentan síntomas clínicos y cuántas no. Se deberá actualizar el censo para tener en cuenta las aves nacidas y muertas

<sup>(1)</sup> DO nº L 303 de 31. 10. 1990, p. 6; Directiva modificada en último lugar por la Directiva 91/496/CEE (DO nº L 268 de 24. 9. 1991, p. 56).

<sup>(2)</sup> DO nº L 224 de 18. 8. 1990, p. 29; Directiva modificada en último lugar por la Directiva 91/496/CEE.

durante el período de sospecha, los datos de este censo deberán actualizarse, y presentarse cuando se solicite, y podrán controlarse en cada visita;

- b) se recluyan todas las aves de corral de la explotación dentro de sus locales habituales o de cualquier otro lugar en el que queden aisladas, sin ningún contacto con otras aves;
- c) se prohíba tanto la entrada de aves de corral en la explotación como la salida de las que se encuentren en ésta;
- d) se subordina a la autorización de la autoridad competente:
- todo movimiento de personas, animales o vehículos cuyo destino u origen sea la explotación,
  - todo movimiento de carne o canales de aves de corral, piensos, material, residuos, deyecciones, cama de paja, estiércol o cualquier otro elemento capaz de transmitir la influenza aviar;
- e) se prohíba la salida de la explotación de huevos, salvo los huevos enviados directamente a un establecimiento autorizado para la fabricación y/o el tratamiento de ovoproductos con arreglo a lo dispuesto en el punto 1 del artículo 6 de la Directiva 89/437/CEE <sup>(3)</sup> y que sean transportados de conformidad con una autorización expedida por la autoridad competente. Esta autorización deberá cumplir los requisitos establecidos en el Anexo I;
- f) se utilicen medios de desinfección apropiados en las entradas y salidas de la explotación y de los edificios en que se hallen las aves de corral;
- g) se realice una investigación epizootiológica con arreglo a lo dispuesto en el artículo 7.

3. Hasta que entren en vigor las medidas oficiales contempladas en el apartado 2, el propietario o avicultor de toda explotación en la que se sospeche la presencia de la enfermedad adoptará todas las medidas razonables que garanticen el cumplimiento de las disposiciones contempladas en dicho apartado, con exclusión de la letra g).

4. La autoridad competente podrá hacer extensivas las medidas previstas en el apartado 2 a otras explotaciones cuando su ubicación, configuración o los contactos con la explotación en que se sospeche la existencia de la enfermedad permitan sospechar una posible contaminación.

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

#### Artículo 5

1. En cuanto se confirme oficialmente que en una explotación se ha declarado la influenza aviar, los Estados miembros velarán por que la autoridad competente, además de las medidas mencionadas en el apartado 2 del artículo 4, ordene:

<sup>(3)</sup> DO nº L 212 de 22. 7. 1989, p. 87; Directiva modificada por la Directiva 89/662/CEE (DO nº L 395 de 30. 12. 1989, p. 13).

- a) el sacrificio inmediato de todas las aves de corral que se hallen en la explotación y la destrucción de las aves de corral muertas o sacrificadas y de todos los huevos. Estas operaciones se efectuarán de manera que se limite al máximo el riesgo de propagación de la enfermedad;
- b) la destrucción o el tratamiento apropiado de todas las materias o residuos, como piensos, camas o estiércol, que puedan estar contaminados. Este tratamiento deberá realizarse ateniéndose a las instrucciones del veterinario oficial y deberá garantizar la destrucción total del virus de la influenza aviar;
- c) en lo posible, la búsqueda y destrucción de la carne de las aves de corral que hayan sido sacrificadas durante el supuesto período de incubación de la enfermedad;
- d) la búsqueda y destrucción de los huevos para incubar puestos durante el supuesto período de incubación que hayan salido de la explotación, quedando entendido que se someterán a vigilancia oficial las aves de corral que hayan nacido de esos huevos; en lo posible, la búsqueda y destrucción de los huevos destinados al consumo puestos durante el supuesto período de incubación que hayan salido de la explotación, salvo en el caso de que hayan sido previamente desinfectados de forma correcta;
- e) después de haberse llevado a cabo las operaciones indicadas en las letras a) y b), la limpieza y desinfección, con arreglo a lo dispuesto en el artículo 11, de los edificios en que se alojen las aves de corral y de sus alrededores, de los vehículos de transporte y de todo material que pueda estar contaminado;
- f) después de realizar las operaciones indicadas en la letra e), la interposición de un período mínimo de veintiún días antes de volver a introducir aves de corral en la explotación;
- g) la realización de una investigación epidemiológica con arreglo a lo dispuesto en el artículo 7.

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

#### Artículo 6

Cuando las explotaciones estén formadas por dos o más manadas independientes, la autoridad competente, basándose en los criterios establecidos por la Comisión con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 21, podrá eximir de las medidas enunciadas en el apartado 1 del artículo 5 a las manadas sanas de una explotación infectada, siempre que el veterinario oficial haya confirmado que las operaciones que se realicen en ella reúnen unas características tales que las manadas permanecen completamente independientes desde el punto de vista de su alojamiento, mantenimiento y alimentación, de modo que no hay peligro de que el virus se contagie de una manada a otra.

#### Artículo 7

1. La investigación epidemiológica estudiará los siguientes aspectos:

- duración del período de la posible presencia de la influenza aviar en la explotación;

- posible origen de la influenza aviar en la explotación y localización de las demás explotaciones en las que se encuentren aves de corral que hayan podido infectarse o contaminarse a partir del mismo foco;
- movimientos de personas, aves de corral u otros animales, vehículos, huevos, carne, canales y cualquier utensilio o material que haya podido transmitir el virus de la influenza aviar a la explotación afectada o propagarlo a partir de la misma.

2. A fin de coordinar todas las medidas necesarias para garantizar la erradicación de la influenza aviar lo más rápidamente posible y con objeto de realizar la investigación epidemiológica, se creará un centro de crisis.

El Consejo, pronunciándose a propuesta de la Comisión, aprobará las disposiciones generales relativas a los centros de crisis nacionales y al centro de crisis comunitario.

#### Artículo 8

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

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

3. Cuando una explotación esté sometida al control oficial de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 y 2, la autoridad competente prohibirá la salida de las aves de corral de la explotación cuando no sea para su transporte directo a un matadero bajo control oficial para su sacrificio inmediato. Antes de que pueda autorizarse tal salida, el veterinario oficial deberá haber efectuado un examen clínico de todas las aves de corral que demuestre que la explotación está libre de influenza aviar. Las restricciones de movimientos mencionadas en el presente artículo se aplicarán durante un período de veintiún días a partir de la última fecha en que pueda haberse producido la contaminación; no obstante, estas restricciones se aplicarán durante un período mínimo de siete días.

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

#### Artículo 9

1. Cuando el diagnóstico de la influenza aviar se haya confirmado oficialmente, los Estados miembros velarán por que la autoridad competente delimite, alrededor de la explotación infectada, una zona de protección de un radio mínimo de tres kilómetros, ella misma inscrita en una zona de vigilancia de un radio mínimo de diez kilómetros. Para la delimitación de estas zonas deberán tenerse en cuenta aquellos factores geográficos, administrativos, ecológicos y epizooticos relacionados con la influenza aviar así como las estructuras de control.

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

- a) localización de todas las explotaciones de la zona con aves de corral;
- b) visitas periódicas a todas las explotaciones con aves de corral, con exámenes clínicos de éstas y, en su caso, toma de muestras para su examen en laboratorio; se llevará un registro de visitas y resultados de los exámenes;
- c) mantenimiento de todas las aves de corral en su alojamiento habitual o en cualquier otro lugar que permita aislarlas;
- d) utilización de sistemas de desinfección apropiadas en las entradas y salidas de las explotaciones;
- e) control de los desplazamientos dentro de la zona de las personas que manipulen aves de corral, sus canales y huevos, así como de los vehículos utilizados para su transporte; en general, se prohibirá el transporte de las aves, exceptuando el tránsito por las carreteras y líneas férreas más importantes;
- f) prohibición de sacar aves de corral y huevos para incubar de la explotación en que se encuentren, salvo que la autoridad competente haya autorizado el transporte:
  - i) de aves para su sacrificio inmediato, preferentemente a un matadero situado en la zona infectada, o, de no ser posible, a uno situado fuera de ésta y designado por la autoridad competente. La carne resultante deberá llevar la marca sanitaria especial establecida en el apartado 1 del artículo 5 de la Directiva 91/494/CEE <sup>(1)</sup>;
  - ii) de pollitos de un día de edad o de pollitas maduras para la puesta a una explotación situada dentro de la zona de vigilancia y que no tenga otras aves de corral. Esta explotación estará sometida al control oficial establecido en el apartado 2 del artículo 8;
  - iii) de huevos para incubar bien a una incubadora designada por la autoridad competente; los huevos y sus envases deberán desinfectarse antes de ser enviados. Los desplazamientos indicados en los puntos i), ii) y iii) deberán ser realizados directamente bajo control oficial y únicamente se autorizarán después de que el veterinario oficial haya efectuado una inspección sanitaria de la explotación. Los medios de transporte empleados deberán limpiarse y desinfectarse antes y después de su utilización;
- g) prohibición de retirar o esparcir sin autorización el estiércol de las aves de corral o sus camas de paja;
- h) prohibición de celebrar ferias, mercados, exposiciones y demás concentraciones de aves de corral o de cualquier otro tipo de aves.

3. Las medidas aplicadas en la zona de protección se mantendrán al menos durante veintiún días después de que se

hayan efectuado en la explotación infectada las operaciones preliminares de limpieza y desinfección con arreglo a lo dispuesto en el artículo 11. Cuando se levanten esas medidas, la zona de protección pasará a formar parte de la zona de vigilancia.

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

- a) localización de todas las explotaciones de la zona con aves de corral;
- b) control de los desplazamientos de las aves de corral y de los huevos para incubar dentro de la zona;
- c) prohibición de sacar aves de corral fuera de la zona durante los quince primeros días, excepto para enviarlas directamente a un matadero situado fuera de la zona de vigilancia y designado por la autoridad competente, en cuyo caso la carne de estas aves deberá llevar la marca sanitaria especial establecida en el artículo 5 de la Directiva 91/494/CEE;
- d) prohibición de sacar huevos para incubar fuera de la zona de vigilancia, salvo que se envíen a una incubadora designada por la autoridad competente. Antes de ser enviados, los huevos y sus envases deberán ser desinfectados;
- e) prohibición de sacar estiércol de aves de corral o sus camas de paja fuera de la zona;
- f) prohibición de celebrar ferias, mercados, exposiciones y demás concentraciones de aves de corral o de cualquier otro tipo de aves;
- g) sin perjuicio de las disposiciones contempladas en las letras a) y b), prohibición de transportar aves de corral, exceptuando el tránsito por las carreteras y líneas férreas más importantes.

5. Las medidas aplicadas en la zona de vigilancia se mantendrán al menos durante treinta días después de haberse realizado en la explotación infectada las operaciones preliminares de limpieza y desinfección con arreglo a lo dispuesto en el artículo 11.

6. En caso de que las zonas estuvieran ubicadas en el territorio de varios Estados miembros, las autoridades competentes de los Estados miembros afectados colaborarán con el fin de delimitar las zonas a las que hace referencia en el apartado 1. En caso de que fuera necesario se delimitarán, de todos modos, la zona de protección y la zona de vigilancia con arreglo al procedimiento que se prevé en el artículo 21.

#### Artículo 10

Los Estados miembros velarán por que:

- a) la autoridad competente establezca las normas que le permitan seguir los desplazamientos de huevos y de aves de corral;
- b) a petición de la autoridad competente, el propietario o el avicultor deba facilitarle los datos sobre las entradas y salidas de su explotación de aves de corral;
- c) cualquier persona que se dedique al transporte o al comercio de aves de corral y de huevos pueda informar a la autoridad competente sobre los desplazamientos de aves y huevos que haya transportado o comercializado y aportar documentación detallada al respecto.

<sup>(1)</sup> DO nº L 268 de 24. 9. 1991, p. 35.

*Artículo 11*

Los Estados miembros velarán por que:

- a) los desinfectantes que se vayan a utilizar así como su concentración estén oficialmente autorizados por la autoridad competente;
- b) las operaciones de limpieza y desinfección se efectúen bajo la supervisión oficial y con arreglo:
  - i) a las instrucciones del veterinario oficial,
  - ii) al procedimiento previsto en el Anexo II para la limpieza y desinfección de las explotaciones infectadas.

*Artículo 12*

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

*Artículo 13*

Los Estados miembros velarán por que la autoridad competente adopte todas las medidas necesarias y oportunas para que todos los habitantes de la zona de protección y de vigilancia estén completamente informados de las restricciones vigentes y se atengan a todas las disposiciones que se impongan para la aplicación adecuada de las medidas correspondientes.

*Artículo 14*

1. Los Estados miembros velarán por que en cada Estado miembro se designen:

- a) un laboratorio nacional, que se mantendrá dotado de las instalaciones y el personal especializado necesarios, para realizar la evaluación de la patogenicidad de los virus de la influenza que se hayan aislado, con arreglo al capítulo 7 del Anexo III, y la identificación de los subtipos H5 o H7 del virus de la influenza A;
- b) un laboratorio nacional encargado de controlar los reactivos utilizados por los laboratorios regionales;
- c) un instituto o laboratorio nacional en el cual las vacunas autorizadas puedan ser controladas para verificar su conformidad con las especificaciones contempladas en la autorización de comercialización.

2. Los laboratorios nacionales indicados en el Anexo IV se encargarán de la coordinación de las normas y los métodos de diagnóstico, el uso de reactivos y el control de vacunas.

3. Los laboratorios nacionales indicados en el Anexo IV se encargarán de la coordinación de las normas y los métodos de diagnóstico establecidos en cada laboratorio de diagnóstico de la influenza aviar en el Estado miembro. A tal fin:

- a) podrán proporcionar a los laboratorios nacionales reactivos para el diagnóstico;
- b) controlarán la calidad de todos los reactivos de diagnóstico utilizados en ese Estado miembro;

- c) organizarán periódicamente pruebas comparativas;
- d) mantendrán aislados virus de la influenza aviar recogidos de casos confirmados en ese Estado miembro;
- e) confirmarán los resultados positivos obtenidos en los laboratorios de diagnóstico regionales.

4. Habrá una conexión entre los laboratorios nacionales indicados en el Anexo IV y el laboratorio comunitario de referencia mencionado en el artículo 15.

*Artículo 15*

El laboratorio comunitario de referencia para la influenza aviar se indica en el Anexo V. Sin perjuicio de lo dispuesto en la Decisión 90/424/CEE, y especialmente en su artículo 28, las competencias y funciones de este laboratorio son las que figuran en dicho Anexo.

*Artículo 16*

La vacunación contra la influenza aviar con vacunas autorizadas por la autoridad competente sólo podrá realizarse como complemento de las medidas de control que se adopten cuando se declare la enfermedad y de acuerdo con las disposiciones siguientes:

- a) La Comisión, en colaboración con el Estado miembro afectado, tomará la decisión de realizar la vacunación como complemento de las medidas de control, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21. Tal decisión se basará principalmente en los siguientes criterios:
  - la concentración de aves de corral en la zona afectada;
  - las características y composición de la vacuna utilizada;
  - los procedimientos de supervisión de la distribución, el almacenamiento y la utilización de las vacunas;
  - las especies y categorías de aves de corral que vayan a ser vacunadas;
  - las zonas en que se vaya a efectuar la vacunación.

No obstante lo dispuesto en el párrafo primero, la decisión de llevar a cabo la vacunación de emergencia en la zona alrededor del foco podrá ser adoptada por el Estado miembro de que se trate previa notificación a la Comisión, siempre que no se perjudique a los intereses fundamentales de la Comunidad. Dicha decisión será revisada inmediatamente en el marco del Comité veterinario permanente, con arreglo al procedimiento previsto en el artículo 21.

- b) Cuando, de conformidad con la letra a) un Estado miembro esté autorizado para recurrir a la vacunación de emergencia en una parte limitada de su territorio, el estatuto del resto del territorio no se verá afectado, siempre que se apliquen las normas de inmovilización de los animales vacunados durante un período que se determinará por el procedimiento expuesto en el artículo 21.

*Artículo 17*

1. Cada Estado miembro preparará un plan de urgencia en el que se especifiquen las medidas que deberán aplicarse a escala nacional en caso de que se registren brotes de influenza aviar.

Este plan deberá permitir el acceso a las instalaciones, equipo, personal y cualquier otro material adecuado necesario para la rápida y eficaz erradicación del brote.

2. Los criterios que deberán aplicarse para la elaboración de los planes figuran en el Anexo VI.

3. Los planes elaborados con arreglo a los criterios enunciados en el Anexo VI serán sometidos a la Comisión, a más tardar seis meses después de la puesta en aplicación de la presente Directiva.

4. La Comisión examinará los planes para determinar si permiten alcanzar el objetivo perseguido y sugerirá al Estado miembro en cuestión cualquier modificación que sea necesario introducir, en particular para que resulten compatibles con los de los demás Estados miembros.

La Comisión aprobará los planes, modificados si fuera necesario, con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 21.

Posteriormente, con arreglo al mismo procedimiento, podrán modificarse o ampliarse según lo aconseje la evolución de la situación.

#### Artículo 18

1. Los expertos de la Comisión podrán realizar inspecciones sobre el terreno, ello en la medida en que resulte necesario para una aplicación uniforme de la presente Directiva y en colaboración con las autoridades competentes. Para ello, podrán verificar, inspeccionando un porcentaje representativo de instalaciones, si las autoridades competentes están comprobando que en éstas se respeta lo dispuesto en la presente Directiva. La Comisión comunicará a los Estados miembros los resultados de la investigación.

El Estado miembro en cuyo territorio se realice una inspección facilitará a los expertos la asistencia necesaria para el desempeño de sus funciones.

Las normas de desarrollo del presente artículo se establecerán por el procedimiento expuesto en el artículo 21.

#### Artículo 19

Las condiciones de participación financiera de la Comunidad en las acciones relacionadas con la aplicación de la presente Directiva están definidas en la Decisión 90/424/CEE.

#### Artículo 20

Los Anexos serán modificados, cuando fuere necesario, por el Consejo por mayoría cualificada, a propuesta de la Comisión, en particular para adaptarlos a la evolución de las investigaciones y de los procedimientos de diagnóstico.

#### Artículo 21

1. Cuando se recurra al procedimiento definido en el presente artículo, el Comité veterinario permanente, creado mediante la Decisión 68/361/CEE <sup>(1)</sup>, denominado en lo sucesivo «el Comité», será convocado sin demora por su presidente, bien por iniciativa de éste, bien a petición del representante de un Estado miembro.

2. El representante de la Comisión someterá al Comité un proyecto de las medidas que deban adoptarse. El Comité dictaminará sobre dicho proyecto en un plazo que el presidente podrá fijar en función de la urgencia de la cuestión. El dictamen se emitirá por la mayoría prevista en el apartado 2 del artículo 148 del Tratado, relativo a la adopción de decisiones por el Consejo a propuesta de la Comisión. En las votaciones que tengan lugar en el seno del Comité, se ponderarán los votos de los representantes de los Estados miembros tal y como prevé dicho artículo. El presidente no participará en la votación.

3. a) La Comisión aprobará las medidas previstas cuando se ajusten al dictamen del Comité.

b) En caso de que las medidas previstas no se ajusten al dictamen del Comité, o de no haberse emitido éste, la Comisión presentará sin demora al Consejo una propuesta de medidas. El Consejo se pronunciará por mayoría cualificada.

Si el Consejo no se hubiese pronunciado al finalizar un plazo de tres meses a partir de la fecha en que se le consultó, la Comisión aprobará las medidas propuestas, excepto si el Consejo se hubiese pronunciado por mayoría simple en contra de las mismas.

#### Artículo 22

Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo dispuesto en la presente Directiva antes del 1 de enero de 1993. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten disposiciones, éstas contendrán una referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en el momento de su publicación oficial. Las características de tal referencia las determinarán los Estados miembros.

#### Artículo 23

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 19 de mayo de 1992.

Por el Consejo

El Presidente

Arlindo MARQUES CUNHA

<sup>(1)</sup> DO nº L 265 de 18. 10. 1968, p. 23.

## ANEXO I

**AUTORIZACIÓN PARA EXTRAER HUEVOS DE UNA EXPLOTACIÓN QUE ESTÉ SUJETA A LAS CONDICIONES ESTABLECIDAS EN LA LETRA e) DEL APARTADO 2 DEL ARTÍCULO 4 DE LA PRESENTE DIRECTIVA**

La autorización expedida por la autoridad competente a efectos de transporte de huevos de una explotación sospechosa sujeta a lo dispuesto en la letra e) del apartado 2 del artículo 4 hacia un establecimiento autorizado para la fabricación y tratamiento de ovoproductos conforme a lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 6 de la Directiva 89/437/CEE, denominado en lo sucesivo «establecimiento designado», deberá ajustarse a los siguientes requisitos:

- 1) para que puedan extraerse huevos de la explotación sospechosa, éstos deberán:
  - a) ajustarse a lo dispuesto en el capítulo IV del Anexo de la Directiva 89/437/CEE;
  - b) ser directamente enviados de la explotación sospechosa al establecimiento designado; el veterinario oficial de la explotación sospechosa deberá precintar cada envío previamente a su salida, quedando éstos precintados mientras dure el transporte hasta el establecimiento designado;
- 2) el veterinario oficial de la explotación sospechosa informará a la autoridad competente del establecimiento designado de su intención de enviarle los huevos;
- 3) la autoridad competente responsable del establecimiento designado se cerciorará de que:
  - a) los huevos a que hace referencia la letra b) del punto 1 permenezcan alejados de los demás huevos desde su llegada hasta su tratamiento;
  - b) las cáscaras de los mismos consideradas como material de alto riesgo con arreglo a lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 2 de la Directiva 90/667/CEE <sup>(1)</sup> y serán tratadas conforme a lo dispuesto en el capítulo II de la misma Directiva;
  - c) el material de embalaje, los vehículos utilizados para el transporte de los huevos a que hace referencia la letra b) del punto 1, así como todos los lugares que hayan entrado en contacto con los huevos deberán limpiarse y desinfectarse de tal forma que quede eliminado todo virus de la influenza aviaria;
  - d) el veterinario oficial de la explotación sospechosa sea informado de cualquier expedición de huevos tratados.

<sup>(1)</sup> DO n° L 363 de 27. 12. 1990, p. 51.

## ANEXO II

## PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE UNA EXPLOTACIÓN INFECTADA

## I. Limpieza previa y desinfección

- a) En cuanto se retiren los canales de las aves con vistas a su eliminación, las partes de los locales en que se hubieran encontrado dichas aves, así como cualquier parte del edificio, corral, etc. contaminado durante el sacrificio o la inspección *post mortem* deberán rociarse con desinfectante autorizado conforme a lo dispuesto en el artículo 11 de la presente Directiva.
- b) Todo tejido de ave y huevos que pudiera haber contaminado edificios, corrales, utensilios, etc. deberá recogerse con cuidado a fin de que se elimine junto con las canales.
- c) El desinfectante utilizado deberá permanecer sobre la superficie tratada durante al menos 24 horas.

## II. Limpieza final y desinfección

- a) Deberá eliminarse de cualquier superficie con un producto desengrasante la grasa y las manchas que se lavarán posteriormente con agua.
- b) Tras el lavado con agua que se menciona en la letra a), se rociarán nuevamente las superficies con desinfectante.
- c) Una vez transcurridos siete días, los locales deberán tratarse mediante un producto desengrasante, enjuagarse con agua fría, rociarse con desinfectante y enjuagarse de nuevo con agua.
- d) El estiércol o pajazas utilizadas deberán tratarse mediante un método idóneo para eliminar el virus. Dicho método deberá incluir una de las siguientes manipulaciones:
  - i) se incinerarán o se tratarán por vapor a una temperatura de 70 °C;
  - ii) se enterrarán a una profundidad que impida el acceso a parásitos y aves salvajes;
  - iii) se amontonarán y humidificarán (si resultare necesario para facilitar la fermentación), se cubrirán para mantener el calor de forma que se alcance una temperatura de 20 °C y se mantendrán cubiertos durante 42 días de modo que se evite el acceso de parásitos y aves salvajes.



## ANEXO III

## MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA CONFIRMACIÓN Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA INFLUENZA AVIAR

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

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

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

## CAPÍTULO 1

## Toma de muestras y tratamiento de las mismas

## 1. Muestras

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

## 2. Tratamiento de las muestras

Aunque los órganos y los tejidos mencionados en el punto 1 pueden mezclarse, las materias fecales deberán tratarse por separado. Se sumergirán completamente los hisopos en una cantidad suficiente de medio con antibióticos. A su vez, las muestras de materias fecales y de órganos deberán homogeneizarse (en un mezclador cerrado o utilizando un mortero y arena esterilizada) en un medio con antibióticos para convertirlas en suspensiones en ese medio al 10-20% p/v. Posteriormente, esas suspensiones se dejarán a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente (o durante más tiempo a una temperatura de 4 °C) y se clarificarán por centrifugación (por ejemplo, de 800 a 1 000 g durante 10 minutos).

## 3. Medio con antibióticos

Diferentes laboratorios han utilizado distintos medios con antibióticos, obteniendo buenos resultados. En cada país, los laboratorios nacionales podrán asesorar al respecto. Para las muestras de materias fecales es necesaria una fuerte concentración de antibióticos; una mezcla típica es la siguiente: 10 000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina, 0,25 mg/ml de gentamicina y 5 000 unidades/ml de micostatina en una solución salina amortiguadora de fosfato. Estos niveles pueden reducirse hasta cinco veces cuando se trabaje con tejidos e hisopos traqueales. Para evitar el crecimiento de Chlamydia, pueden añadirse 50 mg/ml de oxitetraciclina. Al elaborar el medio, es imprescindible comprobar el pH después de añadir los antibióticos y corregirlo hasta que fluctúe entre 7,0 y 7,4.

## CAPÍTULO 2

## Aislamiento del virus

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

Deberán inocularse dosis de 0,1 a 0,2 ml del líquido sobrenadante clarificado dentro de la cavidad alantoidea de al menos 4 huevos embrionados que hayan sido incubados de 8 a 10 días. Es preferible que los huevos procedan de una manada exenta de patógenos específicos, aunque, si ello no fuera posible, podrán utilizarse huevos de una manada exenta de anticuerpos del virus de la influenza aviar. Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37 °C y se examinarán al trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos serán refrigerados a 4 °C a medida que se vayan comprobando. Los demás lo serán a la misma temperatura 6 días después de la inoculación. Los fluidos alantoideos amnióticos se someterán además a la prueba de hemaglutinación. Si ésta resultase negativa, deberá repetirse este procedimiento utilizando fluido alantoideo o amniótico no diluido, como inóculo.

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

## CAPÍTULO 3

## Diagnóstico diferencial

1. *Diferenciación preliminar*

Teniendo en cuenta que es fundamental que se adopten medidas para limitar la propagación del virus lo antes posible, cada laboratorio regional deberá estar en condiciones de detectar cualquier virus hemaglutinante aislado, tales como los del subtipo H5 o H7 de la influenza, además de los de la enfermedad de Newcastle. Los fluidos hemaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de la hemaglutinación descritas en los capítulos 5 y 6. Una inhibición positiva, es decir de 2<sup>4</sup> o más, con antisuero policlonal específico para los subtipos H5 o H7 de la influenza A (con un título de al menos 2<sup>9</sup>), se considerará una identificación preliminar suficiente para imponer medidas provisionales de control.

2. *Confirmación de la identificación*

Dado que hay 13 subtipos de hemaglutinina y 9 subtipos de neuraminidasa del virus de la influenza y que en cada uno de ellos se presentan variaciones, no es viable ni rentable que cada laboratorio nacional tenga antisueros que posibiliten una caracterización antigénica completa del virus de la influenza. No obstante, cada laboratorio nacional deberá:

- i) confirmar que el microorganismo es un virus de la influenza A utilizando una prueba de inmunodifusión doble para detectar el antígeno de grupo, efectuada de acuerdo con el capítulo 9 (si así lo prefieren, los laboratorios nacionales podrán emplear técnicas de inmunofluorescencia o ELISA para la detección de los antígenos de grupo);
- ii) determinar si el virus aislado es o no del subtipo H5 o H7;
- iii) realizar pruebas del índice de patogenicidad intravenosa en pollos de seis semanas de edad, efectuadas de acuerdo con el capítulo 7 del presente Anexo. Un índice de patogenicidad intravenosa superior a 1,2 es la señal de que hay virus y de que es necesario aplicar a fondo las medidas de control (sería útil que los laboratorios nacionales realizaran también pruebas de determinación de la capacidad del virus para producir placas en cultivos de células, efectuadas de acuerdo con el capítulo 8).

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

3. *Tipificación y caracterización adicional del material*

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

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

## CAPÍTULO 4

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

1. Tratándose de programas de erradicación en los que el subtipo H del virus ya se conoce, o cuando se utiliza el virus homólogo como antígeno, el control serológico para poner de manifiesto la infección puede llevarse a cabo mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación realizadas según el método descrito en los capítulos 5 y 6.

Si el subtipo de hemaglutinina no se conoce, la prueba de que la infección es producida por virus de la influenza A podrá obtenerse detectando anticuerpos dirigidos a los antígenos específicos del grupo.

Con ese fin podrá emplearse una prueba de inmunodifusión doble (tal como se describe en el capítulo 9) o una prueba ELISA (ésta presenta el inconveniente de la especificidad del hospedador de la prueba ya que depende de la detección de las inmunoglobulinas del hospedador). Las aves acuáticas raras veces dan resultados positivos al practicarse pruebas de inmunodifusión doble y, a menos que se conozca el subtipo, es probable que tales aves sólo puedan examinarse para comprobar la presencia de anticuerpos en los subtipos H5 y H7.

2. a) *Muestras*

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

b) *Detección de los anticuerpos*

Convendría investigar la capacidad de las muestras individuales de suero para inhibir el antígeno hemaglutinante del virus de la influenza aviar en pruebas estándar de inhibición de la hemaglutinación efectuadas de acuerdo con el capítulo 6.

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

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

## CAPÍTULO 5

## Prueba de hemaglutinación (HA)

*Reactivos*

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

*Método*

1. Distribuir 0,025 ml de SSIAF en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación (utilizar pocillos con fondo en V).
2. Introducir 0,025 ml de suspensión de virus (es decir, fluido alantoideo) en el primer pocillo.
3. Utilícese una micropipeta para hacer diluciones del virus posdesdoblamiento (de 1:2 a 1:4096) de un pocillo a otro.
4. Añadir otros 0,025 de PBS en cada pocillo.
5. Añadir 0,025 ml de una suspensión al 1% de hematíes a cada pocillo.
6. Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4 °C.
7. Examinar las placas después de 30 o 40 minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de un movimiento de los hematíes en forma de lágrima. Los pocillos en los que no se haya producido la hemaglutinación deberán presentar un movimiento similar al de los pocillos de control que no contengan virus.
8. El título de hemaglutinación será la mayor dilución que produzca la aglutinación de los hematíes. Puede considerarse que tal dilución contiene una unidad de hemaglutinación. Otro método más preciso para determinar el título de hemaglutinación consiste en realizar pruebas de hemaglutinación con virus de una gama completa de diluciones iniciales por ejemplo, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, etc. Este método se recomienda para preparar con gran precisión antígenos para las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (capítulo 6).

## CAPÍTULO 6

## Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)

*Reactivos*

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

*Método*

1. Distribuir 0,025 ml de SSIAF en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (utilizar pocillos con fondo en V).
2. Introducir 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.

3. Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
4. Añadir 0,025 ml de fluido alantoideo diluido que contenga 4 u 8 unidades de hemaglutinación.
5. Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4 °C durante al menos 60 minutos o dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo.
6. Añadir 0,025 ml de suspensión de hematíes al 1% a todos los pocillos.
7. Homogeneizar golpeando ligeramente las placas y refrigerarlas a 4 °C.
8. Examinar las placas después de 30 a 40 minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrima similar al de los pocillos de control que contengan hematíes (0,025 ml) y SSIAF (0,05 ml) solamente.
9. El título de inhibición de la hemaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa de 4 u 8 unidades de virus (en todas las pruebas deberá incluirse una titulación de hemaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemaglutinación necesarias).
10. La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de 2<sup>3</sup> para 4 unidades de hemaglutinación o de 2<sup>2</sup> para 8 unidades de hemaglutinación con el suero de control negativo y de un título que esté entre el doble y la mitad (un orden de dilución) del título conocido del suero de control positivo.

CAPÍTULO 7

Índice de patogenicidad intravenosa (IVPI)

1. Diluir a 10<sup>-1</sup> fluido alantoideo infeccioso del pase más bajo posible, preferentemente del aslamiento inicial y sin selección alguna, en una solución salina isotónica esterilizada.
2. Inyectar por vía intravenosa en cada uno de los diez pollitos de seis semanas de edad (deberán utilizarse aves libres de patógenos específicos) 0,1 ml de virus diluido.
3. Examinar las aves cada 24 horas durante diez días.
4. Puntuar todas las aves en cada examen: 0 = normal, 1 = enferma, 2 = gravemente enferma y 3 = muerta.
5. Anotar los resultados y calcular el índice del siguiente modo:

Síntomas clínicos	Días después de la inoculación										Total puntuación
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 × 0 = 0
enferma	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 × 1 = 6
gravemente enferma (*)	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 × 2 = 12
muerta	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 × 3 = 228
											Total = 246

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

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

CAPÍTULO 8

Evaluación de la capacidad de formación de placas

1. Normalmente, lo más conveniente es utilizar una serie de diluciones del virus a fin de obtener un número adecuado de placas en el cultivo. Bastará con diluciones decimales hasta llegar a una concentración de 10<sup>-7</sup> en SSIAF.
2. Preparar capas monocelulares confluentes de células de embrión de pollito o una línea celular apropiada (por ejemplo, la línea de riñón de bovino de Madin-Darby) en placas de Petri de 5 cm de diámetro.

3. Introducir 0,2 ml de cada dilución de virus en dos placas de Petri y esperar 30 minutos para que el virus se absorba.
4. Tras lavar tres veces con SSIAF las células infectadas, se cubrirán con un medio apropiado que contenga agar al 1 % p/v (también puede añadirse 0,01 mg/ml de tripsina). Es importante no añadir suero al medio de recubrimiento.
5. Tras 72 horas de incubación a 37 °C, las placas habrán alcanzado un tamaño adecuado. Para observarlas, conviene retirar la capa de agar y teñir la capa monocelular con violeta cristal (0,5 % p/v) en etanol al 25 % (v/v).
6. Todos los virus incubados con tripsina en el medio producirán placas claras. Por el contrario, a falta de tripsina, sólo producirán placas los virus que resulten virulentos para los pollitos.

## CAPÍTULO 9

### Inmunodifusión doble

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

Una preparación adecuada de virus concentrados puede conseguirse sencillamente centrifugando a alta velocidad fluido alantoideo infeccioso y disgregando los virus con detergente de laurilsarcosinato sódico para liberar los antígenos internos de la nucleocápsida y de la matriz. También puede recurrirse a la precipitación ácida añadiendo CIH 1N al fluido alantoideo infeccioso hasta obtener un pH final comprendido entre 3,5 y 4,0; se enfría luego durante al menos una hora a 0 °C y se centrifuga a baja velocidad (1 000 g) durante diez minutos.

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

En 1970, Beard describió la preparación de un producto enriquecido en antígenos de nucleocápsida a partir de membranas corioalantoideas procedentes de huevos infectados. Este método comprende los siguientes pasos: retirar las membranas corioalantoideas de huevos infectados que den positivo a la prueba de hemaglutinina, triturar u homogeneizar las membranas, congelar y descongelar tres veces y centrifugar a continuación a 1 000 g durante diez minutos. Se retira el precipitado y se trata el sobrenadante con formol al 0,1 % para utilizarlo como antígeno.

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

## ANEXO IV

## LISTA DE LABORATORIOS NACIONALES PARA LA INFLUENZA AVIAR

Bélgica	Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles
Dinamarca	National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division, Hangøvej 2, DK-8200 Aarhus N
República Federal de Alemania	Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, Postfach 2 80, D-3100 Celle
Grecia	Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων 66, 26ης Οκτωβρίου, GR-54627 Θεσσαλονίκη Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias Calle del 26 de octubre, 66, 54627 — Tesalónica
España	Centro Nacional de Referencia para la Peste Aviar — Laboratorio Nacional de Sanidad y Producción Animal de Barcelona, Zona Franca Circunvalación-Tramo 6, Esquina Calle 3. Barcelona
Francia	Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires — Laboratoire Central de Recherches Avicoles et Porcines, B.P. 53, F-22440 Ploufragan
Irlanda	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Castleknock, Dublin 15
Italia	Istituto Patologie Aviaire, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli, via Aniezzo, Falcone 394, I-80127 Napoli F Delpino 1
Luxemburgo	Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles
Países Bajos	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Vestiging Virologie, Houtribweg 39, NL-8221 RA Lelystad
Portugal	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), Estrada de Benfica, 701, 1500 Lisboa
Reino Unido	Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, GB-Surrey KT15 3NB

## ANEXO V

## LABORATORIO COMUNITARIO DE REFERENCIA PARA LA INFLUENZA AVIAR

*Nombre del laboratorio*

Central Veterinary Laboratory  
New Haw  
Weybridge  
Surrey KT 15 3NB  
Reino Unido

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

- 1) coordinar, previa consulta a la Comisión, los métodos de diagnóstico de la influenza aviar en los Estados miembros, especialmente, mediante:
  - a) la especificación, posesión y entrega de cepas del virus de la influenza aviar para someterlas a las pruebas serológicas y preparar el antisuero;
  - b) la entrega de los sueros de referencia y de otros reactivos de referencia a los laboratorios de referencia nacionales para armonizar las pruebas y los reactivos empleados en cada Estado miembro;
  - c) la creación y conservación de una colección de cepas y de materia aislada del virus de la influenza aviar;
  - d) la organización periódica de pruebas comparativas comunitarias de los procedimientos de diagnóstico;
  - e) la recogida y selección de datos y todo tipo de información sobre los métodos de diagnóstico utilizados y los resultados de las pruebas efectuadas en la Comunidad;
  - f) la caracterización de la materia aislada del virus de la influenza aviar mediante los métodos más avanzados para lograr una mejor comprensión de la epizootiología de la influenza aviar;
  - g) el seguimiento de la evolución de la situación en todo el mundo del control, epizootiología y prevención de la influenza aviar;
  - h) la realización de una serie de exámenes técnicos sobre el virus de la influenza aviar y otros virus relacionados con éste para poder hacer un diagnóstico diferencial rápido;
  - i) el conocimiento a fondo de la preparación y utilización de los productos de medicina veterinaria inmunológica empleados para la erradicación y control de la influenza aviar;
- 2) contribuir activamente a la identificación de los focos de influenza aviar en los Estados miembros, estudiando la materia aislada del virus enviada para confirmar el diagnóstico, proceder a su caracterización y a los estudios epizootiológicos. Concretamente, el laboratorio debería ser capaz de analizar la secuencia de los nucleótidos para poder así determinar la secuencia de los ácidos aminados extraída en el lugar del corte de la molécula de hemaglutinina de los virus gripales de los subtipos H5 o H7;
- 3) facilitar la formación o readaptación profesional de los expertos en diagnósticos de laboratorio para armonizar las técnicas de diagnóstico en toda la Comunidad.

## ANEXO VI

## CRITERIOS MÍNIMOS APLICABLES A LOS PLANES DE INTERVENCIÓN

Los planes de intervención deberán establecer por lo menos:

- 1) la creación, a nivel nacional, de una célula de crisis destinada a coordinar todas las medidas de urgencia en el Estado miembro afectado;
- 2) una lista de los centros locales de urgencia dotados del equipo adecuado para coordinar las medidas de control a escala local;
- 3) informaciones detalladas sobre el personal encargado de las medidas de urgencia, sus cualificaciones y responsabilidades;
- 4) la posibilidad, para cualquier centro local de urgencia, de establecer contacto con las personas/organizaciones directa o indirectamente afectadas por una infección;
- 5) la disponibilidad de los equipos y materiales necesarios para llevar a cabo de forma apropiada las medidas de urgencia;
- 6) las instrucciones precisas relativas a las acciones que se deban adoptar cuando se sospechen y confirmen casos de infección o de contaminación, incluidos los medios de destrucción de los canales;
- 7) programas de formación para actualizar y desarrollar los conocimientos relativos a los procedimientos sobre el terreno y a los procedimientos administrativos;
- 8) para los laboratorios de diagnóstico, un servicio de examen *post mortem*, la capacidad necesaria para los exámenes serológicos, histológicos, etc., y la actualización de las técnicas de diagnóstico rápido (a estos efectos, procede establecer disposiciones relativas al transporte rápido de muestras);
- 9) precisiones relativas a la cantidad de vacunas contra la influenza aviar que se considera necesaria en caso de reinstauración de la vacunación de urgencia;
- 10) disposiciones reglamentarias para la aplicación de los planes de intervención.