

II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 4 de Agosto de 2006

que aprova um manual de diagnóstico da gripe aviária, conforme previsto na Directiva 2005/94/CE do Conselho

[notificada com o número C(2006) 3477]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2006/437/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

(4) Foram recentemente desenvolvidas análises laboratoriais para assegurar o diagnóstico rápido da gripe aviária.

Tendo em conta a Directiva 2005/94/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2005, relativa a medidas comunitárias de luta contra a gripe aviária e que revoga a Directiva 92/40/CEE⁽¹⁾, nomeadamente o n.º 1, segundo parágrafo, do artigo 50.º,

(5) A experiência adquirida nos últimos anos no controlo da gripe aviária conduziu à identificação dos métodos de amostragem e dos critérios de avaliação dos resultados das análises laboratoriais mais adequados para o diagnóstico correcto desta doença em vários tipos de situações.

Considerando o seguinte:

(6) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

(1) A Directiva 2005/94/CE prevê determinadas medidas preventivas relacionadas com a vigilância e a detecção precoce da gripe aviária e também medidas mínimas de luta contra a doença a aplicar em caso de surto de gripe aviária em aves de capoeira e outras aves em cativeiro.

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

(2) É necessário estabelecer a nível comunitário procedimentos de diagnóstico, métodos de amostragem e critérios de avaliação dos resultados das análises laboratoriais de confirmação de um surto de gripe aviária.

Artigo 1.º

É aprovado o manual de diagnóstico previsto na Directiva 2005/94/CE e definido no anexo da presente decisão.

(3) O anexo VII da Directiva 2005/94/CE estabelece as funções e obrigações do laboratório comunitário de referência para a gripe aviária, a fim de que este coordene, em consulta com a Comissão, os métodos utilizados nos Estados-Membros para o diagnóstico dessa doença. Tais funções e obrigações incluem a organização periódica de testes comparativos e o fornecimento dos reagentes de referência a nível comunitário.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros aplicam o manual de diagnóstico a partir da data em que transpõem a Directiva 2005/94/CE, ou a partir de 1 de Julho de 2007, caso esta data seja anterior.

⁽¹⁾ JO L 10 de 14.1.2006, p. 16.

Artigo 3.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 4 de Agosto de 2006.

Pela Comissão
Markos KYPRIANOU
Membro da Comissão

ANEXO

MANUAL DE DIAGNÓSTICO DA GRIPE AVIÁRIA

CAPÍTULO I

Introdução, objectivos e definições

1. A fim de garantir a uniformidade dos procedimentos de diagnóstico da gripe aviária (GA) na Comunidade, o presente manual de diagnóstico estabelece:
 - a) Orientações e requisitos mínimos a aplicar aos procedimentos de diagnóstico, métodos de amostragem e critérios de avaliação dos resultados de análises laboratoriais para um diagnóstico adequado da GA.
 - b) As análises laboratoriais que devem ser utilizadas no diagnóstico da GA e as técnicas laboratoriais empregues na genotipagem dos isolados de vírus da GA.
 - c) As normas de qualidade e os requisitos mínimos em termos de biossegurança que devem ser observados nos laboratórios de diagnóstico e no transporte das amostras.
2. O manual de diagnóstico destina-se às autoridades responsáveis pelo controlo da GA. Neste contexto, diz sobretudo respeito aos princípios e aplicações das análises laboratoriais e à avaliação dos respectivos resultados, bem como às técnicas laboratoriais.
3. Para efeitos do disposto no presente manual de diagnóstico, para além das definições constantes do artigo 2.º da Directiva 2005/94/CE, aplica-se a definição que se segue:

«Amostra de diagnóstico», qualquer matéria animal, incluindo uma carcaça inteira transportada para efeitos de diagnóstico ou de investigação, mas excluindo animais vivos infectados.
4. A confirmação de GA em aves de capoeira e outras aves em cativeiro deve estar em conformidade com os procedimentos, os métodos de amostragem e os critérios para a avaliação dos resultados das análises laboratoriais estabelecidos no presente manual de diagnóstico, e basear-se em um ou vários critérios indicados nas alíneas a), b) e c):
 - a) A detecção de vírus infecciosos, antigénios ou material genético específico em amostras de tecidos, órgãos, sangue ou excreções de aves de capoeira ou outras aves;
 - b) A detecção de sinais clínicos e lesões *post mortem* da doença nessas aves;
 - c) A demonstração de uma resposta imunitária humoral específica em amostras de sangue dessas aves.
5. A confirmação da infecção de mamíferos com o vírus da gripe de tipo A de origem aviária, quer de alta patogenicidade quer de baixa patogenicidade, dos subtipos H5 ou H7, deve basear-se em, pelo menos, um critério indicado nas alíneas a) ou b):
 - a) A detecção de vírus infecciosos, antigénios ou material genético específico da GA em amostras de tecidos, órgãos, sangue ou excreções de mamíferos;
 - b) A demonstração de uma resposta imunitária humoral específica à GA em amostras de sangue de mamíferos.
6. Os procedimentos, métodos de amostragem e critérios de avaliação dos resultados das análises laboratoriais devem ser:
 - a) Os estabelecidos no presente manual de diagnóstico; ou
 - b) Os autorizados pela autoridade competente, desde que:
 - i) se tenha demonstrado, no seguimento de um teste comparativo organizado pelo laboratório comunitário de referência para a gripe aviária («laboratório comunitário de referência»), a eficácia, em termos de sensibilidade e especificidade, das análises laboratoriais autorizadas, ou
 - ii) se tal avaliação não tiver sido organizada pelo laboratório comunitário de referência no que se refere a um tipo específico de análise laboratorial, a sensibilidade e a especificidade da análise laboratorial autorizada tenham sido validadas pelo laboratório nacional de referência no sentido de que a análise laboratorial é adequada ao fim a que se destina; os resultados dessa validação devem ser enviados ao laboratório comunitário de referência para serem examinados.

CAPÍTULO II

*Descrição da GA, com especial ênfase no diagnóstico diferencial***1. Etiologia e virulência**

A GA é uma infecção viral altamente contagiosa causada por vírus da família *Orthomyxoviridae*, género *influenzavirus* A. Os vírus da gripe de tipo A são os únicos ortomixovírus que, comprovadamente, infectam as aves. Muitas espécies de aves demonstraram ser sensíveis à infecção pelos vírus da gripe de tipo A; as aves aquáticas formam um importante reservatório desses vírus, mas a grande maioria dos isolados recolhidos tem sido de baixa patogenicidade nos frangos e perus, as aves de maior importância económica afectadas pela doença.

Os vírus da gripe de tipo A estão relacionados antígenicamente tanto com nucleoproteínas como com proteínas matriz, mas são classificados em subtipos com base na relação antígenica das glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Presentemente, são reconhecidos 16 subtipos de HA (H1-H16) e 9 subtipos de NA (N1-N9). Cada vírus da gripe de tipo A tem um antígeno HA e um antígeno NA, aparentemente em qualquer combinação.

Os vírus da gripe de tipo A dividem-se em dois grupos com base na sua capacidade para provocar a doença em aves de capoeira sensíveis:

- a) Os vírus da **gripe aviária de alta patogenicidade (GAAP)**, que provocam uma doença extremamente grave caracterizada por uma infecção generalizada das aves de capoeira infectadas, podendo causar uma taxa de mortalidade muito elevada nos bandos (até 100 %); e
- b) Os vírus da **gripe aviária de baixa patogenicidade (GABP)**, que provocam uma doença leve, sobretudo respiratória, nas aves de capoeira, excepto se houver uma exacerbação devido a outras co-infecções ou outros factores.

As aves selvagens, especialmente as aves aquáticas migratórias, desempenham um papel muito importante como reservatório do vírus da gripe do tipo A, como demonstrado pelo isolamento de quase todas as possíveis combinações dos subtipos HA e NA em aves selvagens. Geralmente, excepto quando tenha havido um alastramento de GAAP a partir de aves de capoeira infectadas, só se detectam nas aves selvagens vírus de GABP.

É muito provável que as primeiras introduções de vírus da GA em explorações avícolas tenham tido origem no contacto directo ou indirecto com aves selvagens.

Nas aves de capoeira domésticas, existe a possibilidade de que esses vírus da GABP introduzidos a partir de um reservatório selvagem possam circular sem serem detectados, dado que os sinais clínicos são muitas vezes leves ou inexistentes.

Uma vez introduzidas em aves de capoeira, as estirpes do vírus da GABP, dos subtipos H5 ou H7, podem sofrer uma mutação e transformarem-se em estirpes de GAAP. Até à data, apenas os vírus dos subtipos H5 e H7 demonstraram causar GAAP.

Embora pareça que vários mecanismos possam ser responsáveis pela mutação do vírus GABP para o GAAP, os factores que provocam essa mutação não são conhecidos. Em certas situações, a mutação parece ter ocorrido rapidamente no local inicial depois da introdução através de aves selvagens e, noutras situações, o vírus GABP circulou nas aves de capoeira durante meses antes de sofrer a mutação. Por conseguinte, é impossível prever quando essa mutação irá ocorrer. No entanto, pode ser razoável presumir que, quanto mais ampla for a circulação da GABP nas aves de capoeira, mais elevadas são as probabilidades da ocorrência de mutação para a GAAP.

O período de incubação é difícil de estimar e, provavelmente, varia conforme a estirpe do vírus e o hospedeiro, situando-se normalmente entre cinco e seis dias, mas o intervalo para uma determinada ave varia provavelmente entre algumas horas e cerca de sete dias.

2. Sinais clínicos em aves infectadas com o vírus da GAAP

Os sinais clínicos são muito variáveis e são influenciados por factores tais como a virulência do vírus infectante, as espécies afectadas, a idade, o sexo, doenças paralelas e o meio ambiente.

Entre os sinais precoces podem incluir-se a inapetência, a redução do consumo de água e uma mortalidade relativamente baixa. No entanto, por outro lado, a doença pode aparecer subitamente num bando, e muitas aves podem morrer, quer sem sinais premonitórios, quer com sinais mínimos de depressão, inapetência, penas eriçadas e febre. Geralmente, quanto mais tempo as aves sobrevivem, mais marcados são os sinais clínicos. O período para o desenvolvimento dos sinais depende do vírus, do hospedeiro e da dose inicial infectante, juntamente com o sistema pecuário. O vírus propaga-se mais lentamente entre as poedeiras criadas em gaiolas ou as aves criadas ao ar livre do que entre os frangos em aviários.

As galinhas infectadas com o vírus da GAAP podem, inicialmente, pôr ovos de casca mole, mas em breve deixam de pôr. As aves doentes costumam ficar de pé ou sentadas, num estado semicomatoso, com as cabeças a tocar no solo. As cristas e os barbilhões mostram-se cianóticos e edematosos, e podem ter hemorragias petequiais ou equimóticas nas pontas. Observa-se frequentemente uma diarreia aguada profusa e as aves têm uma sede excessiva. A respiração pode ser esforçada e a lacrimação excessiva. Observam-se hemorragias em áreas da pele sem penas. A mortalidade do bando varia entre 50 e 100 %.

Nos frangos produtores de carne, os sinais da GAAP são muitas vezes menos óbvios do que noutras aves de capoeira, incluindo geralmente depressão grave, inapetência, sendo o aumento muito marcado da mortalidade a primeira anormalidade observada. Também podem ser observados edemas da cabeça e do pescoço e sinais neurológicos como torcicolos e ataxia.

A GAAP nos perus é semelhante à observada nas galinhas domésticas, mas alguns vírus da GAAP parecem mais virulentos nos perus, enquanto outros vírus se apresentam menos virulentos.

Nos gansos infectados com o vírus da GAAP, os sinais de depressão, inapetência e diarreia são semelhantes aos das galinhas poedeiras, embora frequentemente com os seios nasais inchados. Aves mais jovens podem exibir sinais neurológicos.

Os patos podem não mostrar sinais clínicos quando infectados com vírus da GAAP, mas há indicações que algumas estirpes induzem sinais semelhantes aos dos gansos, com alguma mortalidade.

Os sinais clínicos podem estar ausentes em avestruzes infectadas com a GAAP e a GABP. Em surtos de GAAP, como nos ocorridos em Itália em 1999/2000, houve indicações de que as pintadas e as codornizes japonesas eram sensíveis a infecções com sinais e taxas de mortalidade parecidas com as da doença em galinhas ou perus. No entanto, alguns estudos experimentais indicaram que as codornizes são resistentes a algumas estirpes de GAAP. Em todas as aves, a presença de anticorpos ao mesmo subtipo H, quer por vacinação quer por infecção natural, pode implicar que a infecção com o vírus da GAAP não tenha sinais clínicos aparentes.

3. Lesões *post mortem* em aves infectadas com o vírus da GAAP

As aves que morrem de forma peraguda podem mostrar lesões macroscópicas mínimas que consistem em desidratação e congestão das vísceras e dos músculos.

Nas aves que morrem depois de uma evolução clínica prolongada, ocorrem hemorragias petequiais e equimóticas em todo o corpo, especialmente na laringe, na traqueia, no proventrículo e na gordura do epicárdio, e em superfícies serosas adjacentes ao esterno. Verificam-se edemas subcutâneos extensos, sobretudo em volta da cabeça e das patas. A carcaça pode estar desidratada. Podem verificar-se focos necróticos amarelos ou cinzentos no baço, fígado, rins e pulmões. O saco aéreo pode conter exsudações. O baço pode estar inchado e hemorrágico.

A GA é caracterizada histologicamente por perturbações vasculares conducentes a edemas, hemorragias e infiltrados perivasculares, especialmente no miocárdio, no baço, nos pulmões, no cérebro, no pâncreas e nos barbilhões. Estão presentes focos necróticos nos pulmões, no fígado e nos rins. No cérebro, podem verificar-se gliose, proliferação vascular e degeneração neuronal.

4. Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial da GAAP, deve atender-se, em especial, às seguintes doenças:

- a) Outras doenças que provocam uma mortalidade elevada súbita, tais como:
 - i) doença de Newcastle;
 - ii) laringotraqueíte infecciosa;

- iii) enterite viral dos patos;
- iv) envenenamentos agudos;
- b) Outras doenças que causam o inchaço das cristas e dos barbilhões, tais como:
 - i) cólera aviária aguda e outras doenças septicémicas; 444844
 - ii) celulite bacteriana da crista e dos barbilhões.

5. Sinais clínicos em aves infectadas com os vírus da GABP

A gravidade da doença produzida pelos vírus da GABP é muito influenciada por:

- a) A estirpe do vírus;
- b) A espécie e a idade do hospedeiro;
- c) O estatuto de imunidade do hospedeiro contra o vírus e especialmente pela presença de outros agentes infecciosos, tais como:
 - i) *Pasteurella* spp.;
 - ii) vírus da doença de Newcastle (incluindo as estirpes da vacina);
 - iii) pneumovírus aviário, vírus da bronquite infecciosa aviária;
 - iv) *E. coli*;
 - v) *Mycoplasma* spp.;
- d) Estados de imunodeficiência;
- e) Factores ambientais (como o excesso de amoníaco, poeira, e temperaturas elevadas ou baixas).

Num extremo, os sinais clínicos da doença podem ser inaparentes ou ligeiros, produzindo apenas sinais respiratórios leves ou problemas com a produção de ovos nas aves poedeiras. No outro extremo, as infecções com os vírus da GABP podem estar associadas a sinais clínicos importantes da doença, especialmente em perus, geralmente com rala, tosse, inchaço dos seios infraorbitais e um estado febril associado a perda de apetite e elevada mortalidade.

A GABP pode ser confundida com muitas doenças com sinais respiratórios ou entéricos, que, por sua vez, também a complicam. Deve-se suspeitar da presença de GA em qualquer surto de doença em aves de capoeira que persista apesar da aplicação de medidas preventivas ou terapêuticas para outras doenças.

6. Sinais clínicos em aves em cativeiro

O espectro de sinais clínicos pode ser muito amplo e, como no caso das aves de capoeira, pode ir de sinais inaparentes a sinais importantes da doença conducentes a uma elevada mortalidade.

Geralmente, a infecção propaga-se mais lentamente numa colectânea de diferentes aves em cativeiro, dada a variedade das espécies presentes, com diferentes sensibilidades, níveis díspares de disseminação do vírus e uma transmissão relativamente lenta devido a uma taxa de contacto reduzida e densidades de animais relativamente baixas.

CAPÍTULO III

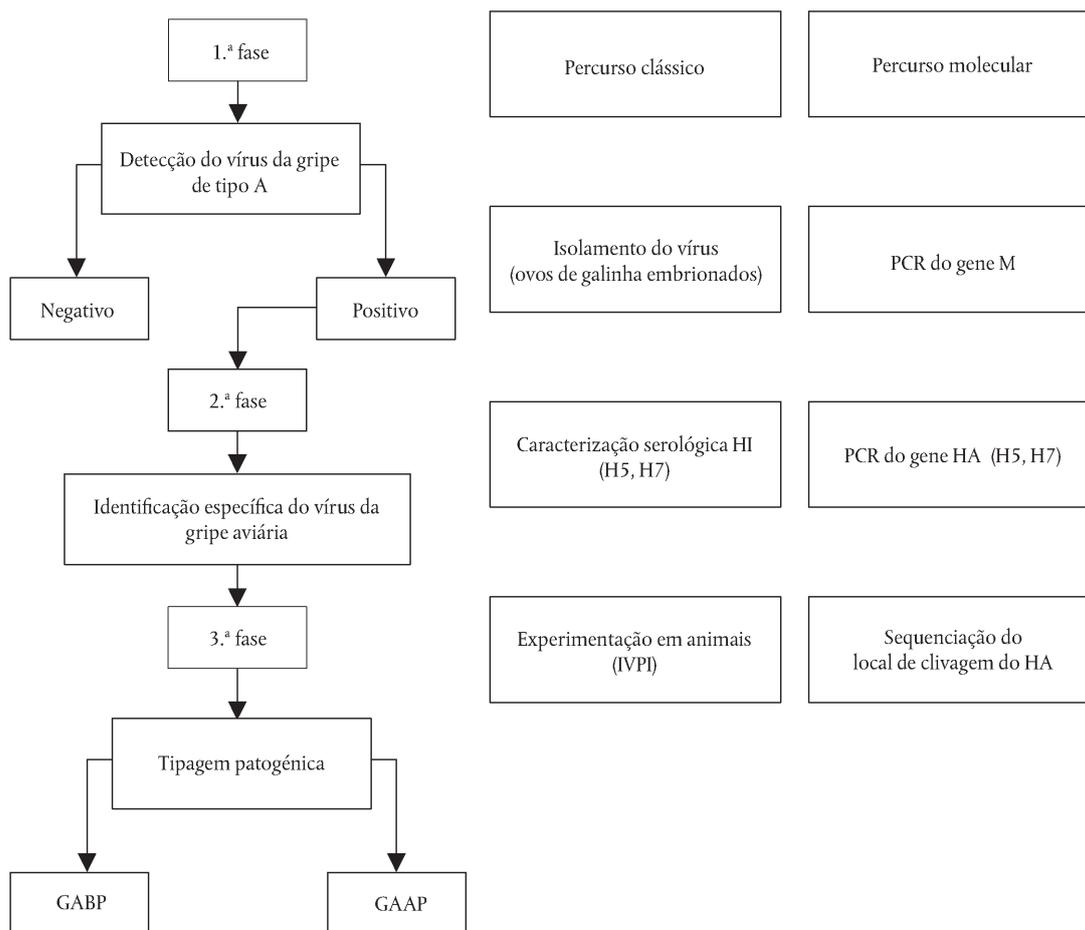
Orientações a observar em caso de suspeita de GA numa exploração

A variedade de sinais clínicos tanto da GAAP como da GABP significa que não é possível haver uma orientação definida para uma suspeita de surto. Uma súbita mortalidade elevada em aves de capoeira com ou sem os sinais clínicos associados descritos no capítulo II deve ser investigada através do envio de amostras para investigação laboratorial, mas, na ausência de uma elevada mortalidade, é mais difícil suspeitar da presença de GA ou de a excluir.

Dado que o diagnóstico rápido da GAAP e da GABP causadas pelos subtipos H5 e H7 é de grande importância no controlo precoce e na erradicação destas doenças, a GA deve sempre ser considerada no diagnóstico diferencial de problemas respiratórios, problemas na produção de ovos e mortalidade elevada em aves de capoeira, devendo as amostras apropriadas ser enviadas para investigação laboratorial.

Figura

Perspectiva esquemática das fases de diagnóstico para confirmação da GA



CAPÍTULO IV

Procedimentos gerais aplicáveis à colheita e ao transporte de amostras

1. A Directiva 2005/94/CE e o manual de diagnóstico

Quando a Directiva 2005/94/CE fizer referência ao manual de diagnóstico, devem ser realizados os procedimentos de investigação, amostragem e vigilância indicados no presente capítulo.

2. Procedimentos a seguir quando haja suspeita de surto de GA

Se o veterinário oficial suspeitar clinicamente de um surto de GA ou se os resultados de qualquer análise laboratorial para essa doença não forem negativos, a autoridade competente deve assegurar que, tal como definido no presente capítulo, seja realizada uma investigação em conformidade com o artigo 7.º da Directiva 2005/94/CE, e completada de forma satisfatória antes de se excluir a presença da doença.

3. Interpretação dos testes virológicos

A autoridade competente pode considerar que a presença do vírus da GA pode ser excluída depois de enviado um número adequado de aves doentes ou mortas e de esfregaços de traqueia/orofaríngeos ou de cloaca, em conformidade com o presente capítulo, para detecção do vírus ou do seu genoma, tendo dado resultados negativos quando testados com um dos métodos especificados de detecção de vírus referidos nos capítulos V ou VI ou autorizados pela autoridade competente em conformidade com a alínea b) do ponto 6 do capítulo I.

4. Conjunto padrão de amostras para análises laboratoriais virológicas ou serológicas

Para a investigação de uma exploração que se suspeite estar infectada com o vírus da GA, o conjunto padrão de amostras para análise virológica ou serológica, como referido nas alíneas a) e b) («amostras padrão»), deve ser colhido e enviado directamente para a realização de análises laboratoriais virológicas e serológicas.

a) O conjunto padrão de amostras para análise virológica compreende:

- i) pelo menos cinco aves doentes/mortas, se existirem; e/ou
- ii) pelo menos 20 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e 20 esfregaços de cloaca.

As carcaças devem ser de aves que morreram recentemente ou que se encontravam gravemente doentes ou moribundas e foram abatidas.

Os esfregaços devem ser colhidos do número de aves referido na alínea a) ou de todas as aves de uma exploração suspeita em que exista um número reduzido de aves. As aves que mostrem sinais clínicos de doença devem ser incluídas nas amostras.

Os esfregaços de cloaca devem estar revestidos de fezes (quantidade óptima: 1 g). Se, por alguma razão, for impraticável fazer esfregaços de cloaca a aves vivas, é possível, em alternativa, colher cuidadosamente amostras de fezes frescas.

Frequentemente, é mais prático colher esfregaços de traqueia/orofaríngeos da cavidade bucal.

Assim que as características de crescimento do vírus sejam conhecidas, a autoridade competente pode decidir escolher entre fazer esfregaços de traqueia/orofaríngeos e fazer esfregaços de cloaca, em vez de ambos, conforme o vírus se replicar melhor no tracto respiratório ou no tracto gastrointestinal, tendo também em conta a espécie em causa;

b) O conjunto padrão de amostras para análise serológica compreende, no mínimo, 20 amostras de sangue.

As amostras devem ser colhidas do número de aves referido na alínea b) ou de todas as aves da exploração em que exista um número reduzido de aves. As aves que pareçam doentes ou que aparentem ter recuperado devem ser incluídas na amostragem.

A autoridade competente pode decidir que não é necessário colher o conjunto completo das amostras padrão, sendo suficiente recolher um subgrupo dessas amostras.

5. Transporte das amostras

Devem ser tomados cuidados especiais no armazenamento e transporte de amostras para o laboratório para análise.

Os esfregaços devem ser arrefecidos imediatamente em gelo ou com pacotes de gel congelado e enviados para o laboratório o mais depressa possível. As amostras não devem ser congeladas excepto se for absolutamente necessário. Se não se garantir o transporte rápido para o laboratório no prazo de 24 horas, as amostras devem ser imediatamente congeladas, armazenadas e depois transportadas sobre gelo seco.

Além disso, e não como alternativa ao arrefecimento, os esfregaços devem ser colocados num meio de transporte antibiótico ou especial para vírus a 4°C, devendo ficar totalmente imersos. Na ausência desse meio, os esfregaços devem ser repostos nos respectivos invólucros e enviados secos para o laboratório para análise.

Dado que o armazenamento e o transporte de amostras podem ser afectados por uma variedade de factores, o método seleccionado para o transporte deve ser adequado à finalidade.

6. Meio antibiótico

O meio antibiótico referido no ponto 5 deve basear-se num tampão fosfato salino a pH 7,0-7,4 (verificado após a adição de antibióticos).

Os meios à base de proteínas, tais como infusão cérebro-coração ou caldo de triptose tamponado com tris, podem proporcionar mais estabilidade ao vírus, especialmente durante o transporte. Os antibióticos utilizados e as suas concentrações podem ser alterados a fim de se adaptarem às condições locais e à disponibilidade.

Podem ser necessários níveis muito elevados de antibiótico para as amostras de fezes, sendo os níveis apropriados: 10 000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina, 0,25 mg/ml de gentamicina e 5 000 UI/ml de nistatina. Estes níveis podem ser reduzidos até cinco vezes no caso dos tecidos e dos esfregaços de traqueia.

Se for necessário controlar a Clamidofila, deve incluir-se 0,05-0,1 mg/ml de oxitetraciclina.

7. Meio com infusão cérebro-coração

A solução deve ser preparada em água e conter 15 % p/v de um caldo em pó de infusão cérebro-coração, antes da esterilização (em autoclave a 121°C/15 minutos).

Depois da esterilização, devem ser acrescentados os seguintes antibióticos: 10 000 UI/ml de penicilina G, 20 µg de amfotericina B e 1 000 µg/ml de gentamicina. Os meios podem ser armazenados a 4°C durante dois meses, no máximo.

8. Procedimentos a ser efectuados, no que se refere às disposições aplicáveis da Directiva 2005/94/CE

8.A. Suspeita de surtos

8.1. N.º 1 do artigo 7.º — Medidas a aplicar nas explorações quando se suspeite de surtos

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração onde se suspeita de um surto, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem. No relatório de inspecção do veterinário oficial, devem ser documentados os dados relativos à mortalidade diária e os dados diários sobre a produção de ovos e sobre o consumo de alimentos e/ou água no período com início uma semana antes da data em que se detectaram os sinais clínicos da GA até à data da inspecção da exploração pelo veterinário oficial;
- Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- A menos que a autoridade competente esteja convencida de que uma suspeita de surto pode ser excluída com base na inspecção clínica, em conformidade com as alíneas a) e b), devem ser colhidas as amostras padrão em cada uma das unidades de produção;
- Independentemente de os testes realizados às amostras padrão apresentarem resultados negativos, e dependendo de factores locais, deve ser realizada uma inspecção clínica das aves de capoeira em cada uma das unidades de produção antes de se poder levantar a vigilância oficial.

8.2. N.º 3 do artigo 10.º — Medidas suplementares baseadas num inquérito epidemiológico

Devem ser colhidas amostras padrão de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro que forem abatidas em cada unidade de produção.

8.B. Gripe aviária de alta patogenicidade (GAAP)

8.3. N.º 4 do artigo 11.º — Medidas a aplicar nos casos de aves de capoeira nascidas de ovos provenientes de explorações onde foram confirmados surtos

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração em que se encontrem aves de capoeira que já eclodiram de ovos recolhidos durante o período de incubação numa exploração onde a GAAP foi confirmada, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração. No relatório de inspecção da exploração do veterinário oficial, devem ser documentados os dados relativos à mortalidade diária e os dados diários sobre o consumo de alimentos e/ou água, se disponíveis, no período com início uma semana antes da data em que se detectaram os sinais clínicos da GAAP até à data da inspecção da exploração pelo veterinário oficial;

- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção e um exame clínico às aves de capoeira, em especial àquelas que parecem estar doentes ou não estão a crescer conforme esperado;
- c) As amostras padrão devem ser colhidas de aves de capoeira entre duas e três semanas de idade;
- d) A vigilância oficial da exploração pode ser levantada após um exame clínico das aves de capoeira com mais de 21 dias e os testes às amostras padrão apresentarem resultados negativos.

8.4. *N.º 2, alínea b), do artigo 13.º — derrogações relativas a certas explorações*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração à qual foi concedida uma derrogação ao n.º 2, primeiro parágrafo, do artigo 11.º da Directiva 2005/94/CE, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Em vez das amostras padrão, devem ser colhidas para análise laboratorial as seguintes amostras, 21 dias depois da data do último resultado positivo de GAAP, em cada unidade de produção, e a intervalos de 21 dias:
 - i) amostras de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro mortas, presentes na altura da colheita de amostras;
 - ii) quando for praticável, esfregaços de traqueia/orofaríngeos e de cloaca de, pelo menos, 60 aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, ou de todas as aves de capoeira ou aves em cativeiro, se a exploração tiver menos de 60 dessas aves; se as aves forem pequenas, exóticas e não estiverem habituadas a ser manuseadas, ou se isso for perigoso para as pessoas, é necessário colher amostras de fezes frescas.

No entanto, a autoridade competente pode conceder derrogações à dimensão da amostra referida nas alíneas i) e ii), com base no resultado de uma avaliação dos riscos;

- d) A colheita de amostras referida na alínea c) e as análises laboratoriais dessas amostras devem continuar até se obterem dois resultados laboratoriais negativos consecutivos, com um intervalo de, pelo menos, 21 dias.

8.5. *N.os 1 e 3 do artigo 15.º — Medidas a aplicar em explorações de contacto*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração de contacto, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem. No relatório de inspecção do veterinário oficial, devem ser documentados os dados relativos à mortalidade diária e os dados diários sobre o consumo de alimentos e/ou água, se disponíveis, no período com início uma semana antes da data de contacto com o bando que se suspeita estar infectado com GA, até à data da inspecção da exploração pelo veterinário oficial;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Se as aves de capoeira ou outras aves em cativeiro revelarem sinais clínicos ou se houver indicações de um aumento da mortalidade diária (> 3 vezes a taxa de mortalidade normal do bando) ou uma redução na produção diária de ovos (> 5 %) ou uma diminuição do consumo diário de comida e/ou água (> 5 %), devem ser imediatamente colhidas as amostras padrão em cada unidade de produção;
- d) Se não se detectarem os sinais referidos nas alíneas b) e c), as amostras padrão devem ser colhidas 21 dias após a data do último contacto suspeito com uma exploração infectada ou do abate das aves de capoeira ou outras aves em cativeiro.

8.6. *Alíneas b) e c) do artigo 18.º — Recenseamento e inspecções pelo veterinário oficial e vigilância nas explorações na zona de protecção*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração comercial, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração. Se houver indicações de um aumento da mortalidade diária (> 3 vezes a taxa de mortalidade normal do bando) ou uma redução na produção diária de ovos (> 5 %) ou uma diminuição do consumo diário de comida e/ou água (> 5 %), devem ser colhidas as amostras padrão em cada unidade de produção;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira e outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;

- c) Caso seja improvável que as espécies de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro mostrem claramente sinais de doença, ou no caso de aves vacinadas, a autoridade competente pode decidir, com base no resultado de uma avaliação dos riscos, que as amostras padrão sejam colhidas em cada unidade de produção;
- d) Com base no resultado de uma avaliação dos riscos, a autoridade competente deve tomar uma decisão quanto à necessidade de uma vigilância oficial suplementar através de inspeções clínicas e recolha de amostras para análises laboratoriais em explorações, compartimentos ou tipos de produção específicos.

8.7. *Alínea f) do artigo 19.º — Medidas a aplicar em explorações nas zonas de protecção*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração onde se registou um aumento da morbilidade, da mortalidade ou uma alteração dos dados de produção, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração. Se houver indicações de um aumento da mortalidade diária (> 3 vezes a taxa de mortalidade normal do bando) ou uma redução na produção diária de ovos (> 5 %) ou uma diminuição do consumo diário de comida e/ou água (> 5 %), devem ser colhidas as amostras padrão em cada unidade de produção;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes.

8.8. *Alínea b) do artigo 23.º — Derrogações aplicáveis ao transporte directo de aves de capoeira para bate imediato*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração à qual foi concedida uma derrogação ao artigo 22.º da Directiva 2005/94/CE, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos a quaisquer aves de capoeira, especialmente as que parecem estar doentes, menos de 24 horas antes da partida das aves de capoeira;
- c) Com base no resultado de uma avaliação dos riscos pela autoridade competente e em vez das amostras padrão, devem ser realizados pelo menos 60 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e/ou 60 esfregaços de cloaca de aves de capoeira de cada unidade de produção a enviar para abate, menos de 48 horas antes da data de partida das aves de capoeira.

8.9. *Alínea b) do artigo 25.º — Derrogações aplicáveis ao transporte directo de aves de capoeira prontas para a postura*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração à qual foi concedida uma derrogação ao artigo 22.º, antes do transporte directo de aves de capoeira prontas para a postura, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira, especialmente as que parecem estar doentes, menos de 24 horas antes da partida das aves de capoeira;
- c) Com base no resultado de uma avaliação dos riscos pela autoridade competente e em vez das amostras padrão, devem ser realizados pelo menos 60 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e/ou esfregaços de cloaca de aves de capoeira de cada unidade de produção a ser transportadas, menos de 48 horas antes da partida das aves de capoeira.

8.10. *N.º 1, alínea a), do artigo 26.º — Derrogação aplicável ao transporte directo de ovos para incubação e de mesa*

Quando um veterinário oficial inspeciona um bando de origem ao qual foi concedida uma derrogação ao artigo 22.º, antes do transporte directo dos ovos para incubação, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção de 15 em 15 dias;
- c) Devem ser colhidas amostras padrão em cada unidade de produção.

8.11. *N.º 1 do artigo 29.º — Duração das medidas*

As medidas aplicáveis na zona de protecção em conformidade com a secção 3 do capítulo IV da Directiva 2005/94/CE podem ser levantadas, não antes de decorridos 21 dias após as operações preliminares de limpeza e desinfeção das explorações infectadas, desde que:

- a) Todas as explorações comerciais situadas na zona de protecção tenham sido inspeccionadas por um veterinário oficial e todos os controlos, inspecções clínicas e análises laboratoriais, conforme estabelecido nas alíneas a), b) e c) do ponto 8.6 e no ponto 8.7, tenham dado resultados negativos;
- b) Todas as explorações não comerciais identificadas situadas na zona de protecção tenham sido inspeccionadas por um veterinário oficial e nem o exame clínico nem os resultados das análises laboratoriais efectuadas tenham levado à suspeita de infecção de GA;
- c) Qualquer vigilância oficial suplementar efectuada, conforme estabelecido na alínea d) do ponto 8.6, tenha dado resultados negativos.

8.12. *Alínea g) do artigo 30.º — Medidas a aplicar nas zonas de vigilância*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração onde se registou um aumento da morbilidade, da mortalidade ou uma alteração dos dados de produção, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Devem ser colhidas amostras padrão em cada unidade de produção.

8.13. *Artigo 35.º — Investigação da suspeita de presença de GAAP em matadouros e em meios de transporte*

Quando, nos matadouros ou meios de transporte, se suspeitar da presença de GAAP nas aves, o veterinário oficial inspecionará a exploração de origem dessas aves, devendo ser levadas a cabo as seguintes medidas:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, tendo em conta a consulta com o veterinário oficial no matadouro, que deve fornecer pormenores sobre quaisquer dados relativos a inspecções anteriores e resultados de exames *ante e post mortem*;
- c) A menos que a autoridade competente esteja convencida de que a suspeita de presença de GAAP pode ser excluída com base na investigação veterinária, em conformidade com as alíneas a) e b), devem ser colhidas amostras padrão em cada uma das unidades de produção;
- d) Além das amostras padrão, devem ser enviadas para análise laboratorial amostras de, pelo menos, cinco aves doentes, mortas ou abatidas no matadouro com indícios patológicos.

8.14. *N.º 1 do artigo 36.º — Medidas a aplicar nos matadouros*

Após completadas as investigações referidas no ponto 8.13 e desde que os resultados das análises laboratoriais sejam negativos e não exista suspeita clínica da presença de GAAP na exploração de origem e no matadouro, a supervisão oficial pode ser levantada.

8.15. *N.os 1 e 2 do artigo 37.º — Medidas a aplicar em postos de inspecção fronteiriços ou meios de transporte*

8.15.1. Quando um veterinário oficial examinar aves de capoeira ou outras aves em cativeiro mantidas em isolamento, que foram retiradas de um posto de inspecção fronteiriço ou meio de transporte, devido a suspeita ou confirmação de GAAP, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos documentos e registos pertinentes, se esses documentos ou registos existirem;
- b) Um exame clínico dessas aves de capoeira ou outras aves em cativeiro que são mantidas em isolamento e uma inspecção clínica de quaisquer outras aves de capoeira ou aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) As amostras padrão devem ser colhidas de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro de diferentes grades ou gaiolas de transporte.

8.15.2. Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração de origem identificada, em caso de abate das aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, tendo em conta a consulta com o veterinário oficial no matadouro que deve fornecer pormenores sobre quaisquer dados relativos a inspecções anteriores e resultados de exames *ante e post mortem*;
- c) A menos que a autoridade competente esteja convencida de que a suspeita de presença de GAAP pode ser excluída com base na investigação veterinária, em conformidade com as alíneas a) e b), devem ser colhidas amostras padrão em cada uma das unidades de produção;
- d) Além das amostras padrão referidas na alínea c), devem ser enviadas para análise laboratorial amostras de, pelo menos, cinco aves doentes, mortas ou abatidas no matadouro com indícios patológicos;
- e) Desde que os resultados das análises laboratoriais das amostras referidas nas alíneas c) e d) sejam negativos e não exista suspeita clínica de GAAP na exploração de origem e no matadouro, a supervisão oficial pode ser levantada.

8.C. Gripe aviária de baixa patogenicidade (GABP)

8.16. N.º 6, alíneas b) e h), do artigo 39.º — Medidas a aplicar nas explorações quando se confirmem surtos de GABP

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração antes do transporte de aves de capoeira para um matadouro, ou uma exploração em que se encontrem aves de capoeira que já eclodiram de ovos recolhidos durante o período de incubação, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro;
- c) As amostras padrão devem ser colhidas, em cada unidade de produção, de aves a enviar para o matadouro, menos de 48 horas antes da partida das aves de capoeira;
- d) As amostras padrão devem ser colhidas, em cada unidade de produção, de aves de capoeira que já eclodiram de ovos recolhidos durante o período de incubação.

8.17. N.º 2, alínea b), do artigo 40.º — Derrogação aplicável a determinadas explorações onde se confirmem surtos

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração à qual foi concedida uma derrogação ao n.º 2 do artigo 39.º e ao n.º 5, alínea b), do artigo 39.º da Directiva 2005/94/CE, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem;
- b) Uma inspecção clínica, a realizar regularmente, a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Em vez de amostras padrão, devem ser colhidas para análise laboratorial as seguintes amostras, 21 dias depois da data do último resultado positivo de GABP, em cada unidade de produção, e a intervalos de 21 dias:
 - i) amostras de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro mortas, presentes na altura da colheita das amostras;
 - ii) esfregaços de traqueia/orofaríngeos e de cloaca de 60 aves de capoeira e outras aves em cativeiro, ou de todas as aves de capoeira ou outras aves em cativeiro quando a exploração tiver menos de 60 aves; se as aves de capoeira ou outras aves em cativeiro forem pequenas, exóticas e não estiverem habituadas a ser manuseadas, ou se isso for perigoso para as pessoas, é necessário colher amostras de fezes frescas.

No entanto, a autoridade competente pode conceder derrogações à dimensão das amostras referida nas alíneas i) e ii), com base no resultado de uma avaliação dos riscos.

- d) A colheita de amostras referida na alínea c) e as análises laboratoriais dessas amostras devem continuar até se obterem dois resultados laboratoriais negativos consecutivos, com um intervalo de, pelo menos, 21 dias.

8.18. *N.os 1 e 3 do artigo 42.º — Medidas a aplicar em explorações de contacto*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração de contacto, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração de contacto, se esses registos existirem;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) As amostras padrão devem ser colhidas em cada unidade de produção ou quando as aves de capoeira ou outras aves em cativeiro são abatidas.

8.19. *N.º 1, alínea b), do artigo 44.º — Medidas a aplicar nas zonas submetidas a restrições*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração comercial numa zona submetida a restrições, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Devem ser colhidas amostras padrão em cada unidade de produção;
- d) Com base no resultado de uma avaliação dos riscos, a autoridade competente deve tomar uma decisão quanto à necessidade de uma vigilância oficial suplementar através de inspecções clínicas e recolha de amostras para análises laboratoriais em explorações, compartimentos ou tipos de produção específicos.

8.20. *Alíneas a) e b) do artigo 45.º — Duração das medidas*

As medidas aplicáveis na zona submetida a restrições em conformidade com a secção 3 do capítulo V da Directiva 2005/94/CE podem ser levantadas, não antes de decorridos 21 dias após as operações preliminares de limpeza e desinfecção das explorações infectadas depois do seu despovoamento e não antes de 42 dias após a data de confirmação da GABP, desde que:

- a) Todas as explorações comerciais na zona submetida a restrições tenham sido inspeccionadas por um veterinário oficial e todas as análises laboratoriais das amostras referidas nas alíneas c) e d) do ponto 8.13 tenham sido realizadas e os resultados estejam disponíveis;
- b) Os resultados de quaisquer inspecções clínicas e análises laboratoriais suplementares, que podem incluir explorações não comerciais, para determinar o risco de propagação da GABP estejam disponíveis;
- c) A autoridade competente esteja convencida, com base no resultado de uma avaliação dos riscos tendo em conta a situação epidemiológica e os resultados das análises laboratoriais referidas nas alíneas a) e b), de que o risco de propagação da GABP é negligenciável; essa avaliação pode concluir que, em caso de resultados serológicos positivos e resultados virológicos negativos, as restrições podem ser levantadas.

8.D. *Medidas destinadas a evitar a propagação dos vírus da gripe de origem aviária a outras espécies*

8.21. *N.os 1 e 6 do artigo 47.º — Análises laboratoriais e outras medidas respeitantes aos suínos e a outras espécies*

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração onde existem suínos, após a confirmação de GA, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração, se esses registos existirem;
- b) Realizar uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos aos suínos, especialmente os que parecem estar doentes;
- c) Devem ser retirados, antes ou no dia do abate das aves de capoeira ou outras aves em cativeiro infectadas, esfregaços nasais/orofaríngeos de, pelo menos, 60 suínos em cada unidade de produção, ou de todos os suínos se, na unidade de produção, existirem menos de 60 suínos. Devem ser colhidas pelo menos 60 amostras de sangue dos suínos, duas a quatro semanas após a data do abate. As amostras devem ser colhidas de modo a que seja obtida, pelo menos, uma amostra de cada grupo de suínos que estejam em contacto directo uns com os outros;

- d) A circulação de suínos para outras explorações pode ser autorizada se pelo menos 60 esfregaços nasais/orofaríngeos e 60 amostras de sangue de suínos, de cada unidade de produção, colhidos 14 dias após a data dos resultados positivos da presença de GA, tenham revelado resultados negativos.

A circulação de suínos para um matadouro pode ser autorizada se pelo menos 60 esfregaços nasais/orofaríngeos, de cada unidade de produção, colhidos 14 dias após a data dos resultados positivos da presença de GA, tiverem revelado resultados negativos.

Em caso de resultados laboratoriais inconclusivos ou positivos, qualquer outra investigação necessária para excluir a infecção ou transmissão de GA entre os suínos;

- e) Se o veterinário oficial suspeitar que outros mamíferos domésticos presentes nas explorações, especialmente aqueles identificados como tendo sensibilidade à infecção com vírus da GA dos subtipos H5 e H7, tenham estado em contacto com aves de capoeira ou outras aves em cativeiro infectadas, devem ser colhidas amostras para análise laboratorial.

8.E. Repovoamento

8.22. N.º 3, alíneas b) e c), do artigo 49.º — Repovoamento das explorações

Quando um veterinário oficial inspeciona uma exploração comercial que foi repovoada, as seguintes medidas devem ser levadas a cabo:

- a) Uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
- b) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro, especialmente as que parecem estar doentes;
- c) Em vez das amostras padrão, devem ser colhidas em cada unidade de produção as seguintes amostras:
 - i) pelo menos 20 amostras de sangue assim que as aves de capoeira tenham sido introduzidas na exploração, excepto no caso de pintos do dia, ou, se tal for adequado, essa amostragem pode ser realizada na exploração de origem das aves de capoeira antes de estas serem transportadas para a exploração de repovoamento;
 - ii) amostras de aves mortas ou esfregaços tirados das respectivas carcaças, de um máximo de 10 aves mortas por semana durante o período de 21 dias a partir da data do repovoamento;
- d) Se a exploração já tiver estado previamente infectada com GAAP, devem também ser colhidos 20 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e 20 esfregaços de cloaca de aves aquáticas (patos/gansos) em cada unidade de produção, se for necessário, na última semana do período de 21 dias a partir da data de repovoamento;
- e) Se a exploração já tiver estado previamente infectada com GABP, devem ser colhidos 20 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e 20 esfregaços de cloaca, bem como 20 amostras de sangue, em cada unidade de produção.

8.F. Vacinação

8.23. N.º 2, subalínea i), do artigo 56.º — Vacinação preventiva de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro

Devem ser efectuadas análises laboratoriais, conforme disposto no capítulo IX da Directiva 2005/94/CE, às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro vacinadas, utilizando testes DIVA aprovados, se o vírus selvagem for conhecido.

Se forem utilizadas aves-sentinelas, estas devem estar presentes em todos os bandos vacinados, inspeccionadas clinicamente e ser testadas utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI). Para esse efeito, devem ser colhidas 20 amostras de sangue das sentinelas não vacinadas em cada exploração vacinada, pelo menos de 60 em 60 dias.

8.24. Anexo IX — Requisitos aplicáveis à circulação de aves de capoeira e outras aves em cativeiro e produtos à base de aves de capoeira, em relação à vacinação de emergência

A circulação de aves de capoeira e outras aves em cativeiro vivas e dos respectivos ovos deve ser submetida a medidas de monitorização rigorosas a fim de minimizar o risco de maior propagação da infecção pela GA.

Para esse efeito, no início da campanha de vacinação de emergência, as mesmas medidas de monitorização devem ser aplicadas em relação à circulação de aves de capoeira e outras aves em cativeiro vivas e dos respectivos ovos, a fim de minimizar o risco de maior propagação da infecção pela GA dentro e fora da área de vacinação.

- a) Antes da primeira circulação, dentro e fora da área de vacinação, dos ovos para incubação e de mesa e, depois, pelo menos de 30 em 30 dias, o veterinário oficial deve levar a cabo as seguintes medidas:
 - i) uma inspecção clínica das aves de capoeira ascendentes ou poedeiras não vacinadas em cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira, especialmente as que parecem estar doentes; devem ser colhidas amostras padrão de aves de capoeira em cada unidade de produção; ou
 - ii) uma inspecção clínica das aves de capoeira ascendentes ou poedeiras vacinadas em cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves sentinela presentes nesses bandos; devem ser colhidas amostras padrão dessas aves sentinela;
- b) Para a circulação de aves de capoeira ou outras aves em cativeiro vivas vacinadas para outras explorações ou para a circulação de aves de capoeira vivas vacinadas dentro e fora da área de vacinação, o veterinário oficial deve levar a cabo as seguintes medidas:
 - i) uma verificação dos registos de produção e de saúde da exploração;
 - ii) Uma inspecção clínica a cada unidade de produção, incluindo uma avaliação da sua história clínica, e exames clínicos às aves de capoeira ou outras aves em cativeiro nas 72 horas anteriores à data de partida, atendendo especialmente às aves sentinela;
 - iii) quando os resultados da verificação, da inspecção clínica e dos exames referidos nas subalíneas i) e ii) não forem satisfatórios, as amostras padrão devem ser colhidas das sentinelas; no entanto, quando esses resultados forem satisfatórios, devem ser colhidas as seguintes amostras de:
 - aves de capoeira ou outras aves em cativeiro vacinadas: pelo menos 20 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e 20 esfregaços de cloaca, bem como 20 amostras de sangue, utilizando um teste DIVA adequado nas 72 horas anteriores à partida; e
 - aves sentinela: 20 esfregaços de traqueia/orofaríngeos e 20 esfregaços de cloaca, bem como 20 amostras de sangue para serologia, utilizando o teste HI, antes da partida.

CAPÍTULO V

Testes virológicos de diagnóstico e avaliação dos resultados

1. Até à descoberta e ao desenvolvimento de testes de base molecular, o isolamento do vírus através da inoculação de ovos de galinha embrionados era considerado de longe o teste de diagnóstico da GA mais sensível e essencial para a identificação e caracterização subsequentes do vírus infectante. Os passos essenciais estão indicados no presente capítulo.
2. **Tratamento das amostras**

Os esfregaços, se enviados secos, devem ser colocados num meio antibiótico suficiente para assegurar a sua imersão completa. As amostras podem ser agrupadas em lotes de cinco desde que sejam derivadas da mesma espécie, data e unidade epidemiológica.

As carcaças enviadas para o laboratório devem ser submetidas a um exame *post mortem*, devendo colher-se amostras dos seguintes órgãos: fezes ou conteúdo intestinal, tecido cerebral, traqueia, pulmões, fígado, baço e outros órgãos visivelmente afectados. Estes órgãos e tecidos podem ser agrupados, mas é essencial o tratamento separado do material fecal.

As amostras de fezes e de órgãos devem ser homogeneizadas (num misturador fechado ou utilizando um almofariz e pilão e areia estéril) num meio antibiótico, sendo feitas suspensões no meio a 10-20 % p/v.

Os esfregaços imersos e as suspensões devem ser mantidos durante cerca de duas horas à temperatura ambiente (ou períodos mais longos a 4°C) e seguidamente clarificados por centrifugação (por exemplo, 800 a 1 000 x g durante 10 minutos).

3. Isolamento do vírus em ovos de galinha embrionados

O líquido sobrenadante clarificado deve ser inoculado em quantidades de 0,1-0,2 ml na cavidade alantóide de cada um dos quatro ovos de galinha embrionados, pelo menos, incubados durante 9 a 11 dias. De preferência, estes ovos devem ser provenientes de um bando isento de organismos patogénicos especificados (SPF), mas em caso de impossibilidade, podem utilizar-se ovos provenientes de um bando sem anticorpos da GA (soro anticorpos-negativo — SAN).

Os ovos inoculados devem ser mantidos a uma temperatura de 37°C e transiluminados diariamente. Os ovos com embriões mortos ou moribundos, à medida que forem detectados, bem como todos os ovos restantes seis dias após a inoculação, devem ser arrefecidos a uma temperatura de 4°C, procedendo-se à testagem do líquido alantóico-amniótico em relação à actividade de hemaglutinação. Caso não seja detectada a hemaglutinação, este processo é repetido utilizando como inóculo o líquido alantóico-amniótico não diluído. Quando for detectada a hemaglutinação, a presença de bactérias deve ser excluída por meio de cultura. Caso seja detectada a presença de bactérias, os líquidos podem ser passados por um filtro de membrana de 450 nm e após a adição de mais antibióticos devem ser inoculados em ovos embrionados, tal como descrito acima.

A fim de acelerar o diagnóstico, alguns laboratórios têm usado duas passagens de 3 dias ou de 2 dias e 4 dias, registando resultados comparáveis a duas passagens de 6 dias, mas este procedimento ainda não foi plenamente avaliado.

Os líquidos positivos têm de ser testados para confirmar a ausência de bactérias. Caso seja detectada a presença de bactérias, os líquidos podem ser passados por um filtro de membrana de 450 nm ou centrifugados para retirar as bactérias, fazendo uma nova passagem pelos ovos após a adição de mais antibióticos.

4. Diagnóstico diferencial

a) Diferenciação preliminar

Dado ser importante que as medidas de controlo com vista a limitar a propagação do vírus da GA sejam aplicadas o mais depressa possível, cada laboratório nacional de referência que tenha isolado um vírus hemaglutinante deve ser capaz de identificar que se trata de um vírus da gripe de tipo A, subtipo H5 ou H7, ou de um vírus da doença de Newcastle. Os líquidos hemaglutinantes devem ser utilizados em teste de inibição da hemaglutinação, como descrito no capítulo IX. Uma inibição positiva, tal como um título entre 2-3 \log_2 de um controlo positivo, com anti-soros policlonais específicos dos subtipos H5 ou H7 do vírus da gripe de tipo A, pode servir de identificação preliminar e permitir, assim, a imposição de medidas de controlo provisórias.

b) Identificação confirmatória

Uma vez que existem 16 subtipos de hemaglutininas e 9 subtipos de neuraminidase de vírus da gripe e que podem registar-se variações em cada um destes, não é viável nem rentável que cada laboratório nacional de referência mantenha anti-soros que possam permitir uma identificação plena dos subtipos dos isolados da gripe. No entanto, cada laboratório nacional de referência deve, como medida mínima:

- i) confirmar que o isolado é de um vírus da gripe de tipo A, utilizando um teste de dupla difusão imunológica para detectar grupos de antígenos;
- ii) determinar se o isolado é ou não de subtipo H5 ou H7; a identificação positiva exige a aplicação das medidas de controlo dos subtipos H5 e H7 aplicáveis à GABP;
- iii) enviar imediatamente todos os isolados da GAAP e dos subtipos H5 e H7 ao laboratório comunitário de referência para confirmação e plena caracterização, excepto se tiver sido concedida uma derrogação ao abrigo da alínea d);

Além disso, é conveniente que os laboratórios com instalações adequadas:

- iv) realizem um teste do índice da patogenidade intravenosa em frangos com seis semanas, como indicado no capítulo VII. Os índices de patogenidade intravenosa superiores a 1,2 indicam a presença do vírus, exigindo a plena aplicação de medidas de controlo da GAAP.

Os laboratórios nacionais de referência também devem considerar a possibilidade de passarem a dispor de competências especializadas e equipamentos que permitam a sequenciação dos nucleótidos do gene da hemaglutinina, a fim de estabelecer se existem ou não múltiplos aminoácidos de base no ponto de clivagem da proteína precursora da hemaglutinina dos vírus da GABP dos subtipos H5 ou H7. O laboratório comunitário de referência atribuirá elevada prioridade à determinação da patogenidade, no âmbito das obrigações referidas no ponto 2, alínea b), do anexo VII da Directiva 2005/94/CE, mas tal caracterização de vírus realizada a nível nacional reduzirá enormemente o tempo despendido para o diagnóstico e, quando este for positivo, para a plena aplicação das medidas de controlo da GAAP.

c) Outras tipagens e caracterização dos isolados

O laboratório comunitário de referência deve receber dos laboratórios nacionais todos os vírus hemaglutinantes, com vista à realização de outros estudos antigénicos e genéticos que permitam uma melhor compreensão da epizootiologia da(s) doença(s) na Comunidade Europeia, em conformidade com as funções e obrigações do laboratório comunitário de referência, conforme referidas no anexo VII da Directiva 2005/94/CE.

Para além destas funções e obrigações, o laboratório comunitário de referência deve proceder à tipagem completa dos antígenos de todos os vírus de gripe recebidos. Para os vírus de subtipo H5 e H7 que não têm índices de patogenicidade intravenosa superiores a 1,2, a sequenciação dos nucleótidos do gene da hemaglutinina para estabelecer se existem ou não múltiplos aminoácidos de base no ponto de clivagem da proteína precursora da hemaglutinina deve ser realizada imediatamente, e o laboratório nacional de referência e a autoridade competente do país de origem devem ser informados assim que os resultados estejam disponíveis a fim de que as medidas de controlo da GAAP possam ser plenamente aplicadas.

d) Dada a evolução da situação epidemiológica em relação à GAAP/GABP, pode ser possível, mediante acordo com a Comissão e o laboratório comunitário de referência, a concessão de uma derrogação aos laboratórios com plena capacidade de caracterização rápida dos vírus no sentido de enviarem um subgrupo de tais vírus após a inspecção dos dados e que o laboratório comunitário de referência faça uma selecção pertinente. Esta derrogação só pode ser autorizada quando seja possível ao laboratório nacional de referência gerar dados rapidamente e que estes dados sejam partilhados com o laboratório comunitário de referência.

CAPÍTULO VI

Testes moleculares e avaliação dos resultados

A definição actual de GAAP permite a identificação molecular de factores de virulência e confirma a utilização de técnicas moleculares no diagnóstico da GA. Recentemente, tem havido uma evolução na sua aplicação para a detecção e caracterização de vírus da GA directamente de amostras clínicas de aves infectadas. As técnicas convencionais de RT-PCR em amostras clínicas podem, com iniciadores correctamente definidos, resultar na detecção rápida e na identificação dos subtipos (pelo menos H5 e H7) e, a par da amplificação de um fragmento por PCR que poderia ser usado para determinar a sequência dos nucleótidos, revelaram-se como tendo uma aplicação importante na identificação rápida de surtos posteriores após a detecção das instalações infectadas e a caracterização do vírus. O método RT-PCR «em tempo real» numa única etapa, utilizando sistemas de iniciadores/sondas fluorogénicas (rRT-PCR), permite um diagnóstico ainda mais rápido e sensível com detecção de vírus da GA e determinação dos subtipos H5 ou H7 em amostras clínicas.

Um problema importante dos sistemas RT-PCR e rRT-PCR é que, até à data, os diferentes laboratórios desenvolveram sistemas diferentes que, embora perfeitamente legítimos, não foram validados nem submetidos a testes com grandes números de amostras em laboratórios diferentes. O laboratório comunitário de referência e determinados laboratórios nacionais de referência têm tratado este problema no âmbito de um projecto financiado pela Comunidade (EU AVIFLU) a fim de produzir protocolos ratificados para a RT-PCR convencional e a rRT-PCR, que poderiam ser adoptados por outros laboratórios nacionais de referência. Se os parâmetros de ensaio, tais como os tempos de rampa e de ciclo, forem diferentes dos recomendados nos protocolos especificados, deve demonstrar-se que são adequados ao fim a que se destinam antes de serem utilizados, em conformidade com o ponto 6 do capítulo I do presente manual de diagnóstico.

Os protocolos normalizados para esses testes moleculares e a respectiva avaliação, conforme aplicados pelo laboratório comunitário de referência, podem ser consultados no seguinte sítio *web*:

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

CAPÍTULO VII

Teste de patogenicidade *in vivo* e avaliação dos resultados

A virulência para os frangos dos vírus da gripe de tipo A isolados a partir de aves deve ser estimada utilizando o teste do índice de patogenicidade intravenosa (IVPI) que deve ser efectuado da seguinte maneira:

- a) Diluir a 1/10 numa solução isotónica salina estéril líquido alantóico infeccioso fresco com um título HA >1/16 (>2⁴ ou > log₂ 4 quando expresso em termos do inverso) colhido do nível de passagem mais baixo disponível, de preferência do isolamento inicial sem qualquer selecção.
- b) Injectar por via intravenosa 0,1 ml do vírus diluído em cada um dos 10 frangos SPF ou SAN de seis semanas.

- c) Examinar as aves com intervalos de 24 horas, durante dez dias. Em cada observação, cada ave é classificada como 0 se normal, 1 se doente, 2 se muito doente e 3 se morta. A classificação de aves doentes e muito doentes é uma avaliação clínica subjectiva.

Normalmente, as aves «doentes» revelam um dos seguintes sinais e as aves «muito doentes» mais do que um dos seguintes sinais: problemas respiratórios, depressão, diarreia, cianose da pele exposta ou dos barbilhões, edema da face e/ou cabeça, sinais de nervosismo. As aves mortas devem ser classificadas como 3 em cada uma das observações diárias restantes depois da morte.

Por razões de bem-estar animal, quando as aves estão demasiado doentes para comer ou beber, devem ser abatidas e classificadas como mortas na próxima observação dado que morreriam nas próximas 24 horas sem intervenção. Esta abordagem é aceitável para as autoridades de acreditação.

- d) O IVPI é a classificação média por ave e por observação, durante um período de 10 dias. Um índice de 3,00 significa que todas as aves morreram no prazo de 24 horas, e um índice de 0,00 significa que nenhuma ave mostrou qualquer sinal clínico durante o período de observação de 10 dias.

O seguinte exemplo mostra um método simples para registar os resultados e calcular os índices:

Sinais clínicos	Dia após a inoculação										Classificação total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 0 = 0$
Doentes	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Muito doentes	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	$6 \times 2 = 12$
Mortas	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
											Total = 246

Notas:

10 aves observadas durante 10 dias = 100 observações

Índice = resultado médio por ave e por observação = $246/100 = 2,46$

Qualquer vírus da gripe de tipo A, independentemente do subtipo, com um valor superior a 1,2 num teste IVPI é considerado um vírus GAAP.

CAPÍTULO VIII

Testes serológicos e avaliação dos resultados

O melhor método para demonstrar a presença do vírus da gripe de tipo A consiste na demonstração da existência da nucleoproteína ou de antígenos matriz, comum a todos os vírus da gripe de tipo A.

Podem efectuar-se testes de dupla difusão imunológica, recorrendo tanto a preparados de concentrados de vírus como a extractos de membranas corioalantóicas infectadas.

Os melhores métodos utilizados nos testes serológicos para os anticorpos do vírus da GA são os testes de hemaglutinação (HA) e de inibição da hemaglutinação (HI).

O capítulo 2.7.12 do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres do Gabinete Internacional de Epizootias (OIE) contém informações pormenorizadas sobre as técnicas laboratoriais e a avaliação dos resultados.

Os protocolos normalizados para os testes serológicos e a interpretação dos respectivos resultados, conforme aplicados pelo laboratório comunitário de referência, podem ser consultados no seguinte sítio web:

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

CAPÍTULO IX

Sistemas de monitorização associados à vacinação

1. A Directiva 2005/94/CE e o manual de diagnóstico

As secções 2 e 3 do capítulo IX da Directiva 2005/94/CE permitem a utilização da vacinação de emergência e preventiva sob certas condições. Uma dessas condições é a aplicação da estratégia «DIVA» (Differentiating Infected from Vaccinated Animals — Diferenciação entre animais infectados e vacinados).

A vacinação deve visar a prevenção da infecção e a subsequente propagação de vírus entre os bandos. Existem provas irrefutáveis de que a vacinação aumenta a quantidade de vírus necessários para infectar as aves e diminui a quantidade de vírus excretados. Contudo, embora as aves já vacinadas não desenvolvam sinais clínicos, podem ainda propagar o vírus quando lhes é provocada a infecção. Assim, os vírus da GAAP dos subtipos H5 e H7 podem circular despercebidos durante algum tempo num bando com níveis subóptimos de imunidade, tal como podem os vírus da GABP num bando não vacinado. Por conseguinte, é necessário identificarem-se os bandos vacinados positivos que tenham sido infectados pelo vírus selvagem, a fim de se poderem aplicar outras medidas de controlo, tais como o abate sanitário.

2. Utilização de sentinelas para monitorizar a infecção

Ao nível do bando, um método simples é a monitorização regular das aves-sentinelas deixadas por vacinar em cada bando vacinado, mas esta abordagem tem alguns problemas de gestão, nomeadamente na identificação das sentinelas, especialmente em bando grandes. É necessário garantir o contacto entre as aves-sentinelas e as aves vacinadas.

3. Teste de laboratório DIVA para monitorizar a infecção

Em alternativa ou adicionalmente, pode testar-se a exposição no terreno das aves vacinadas utilizando testes de laboratório DIVA. Foram desenvolvidos nos últimos anos vários sistemas de teste que também permitem a detecção da infecção no terreno em aves vacinadas. Um dos métodos que se revelou viável é a utilização de uma vacina que contenha um vírus do mesmo subtipo de hemaglutinina (H), mas de neuraminidase (N) diferente do vírus selvagem prevalente. Os anticorpos à N do vírus selvagem agem como marcadores naturais da infecção.

Este sistema foi utilizado em Itália depois da reaparição de um vírus da GABP H7N1 em 2000. A fim de suplementar medidas de controlo directo, foi aplicada uma estratégia DIVA com uma vacina que continha H7N3 para combater uma infecção selvagem de H7N1. As aves vacinadas e expostas no terreno foram diferenciadas com um teste serológico para detectar anticorpos anti-N1 específicos. A mesma estratégia foi utilizada para controlar a GABP causada por H7N3 em Itália, em 2002-2003, neste caso com uma vacina H7N1 e um teste serológico para detecção de anticorpos especificamente contra a N3. Em ambos os casos, a vacinação e o abate sanitário utilizando esta estratégia DIVA resultaram na erradicação do vírus selvagem.

Podem surgir problemas com este sistema se aparecer um vírus selvagem com o mesmo antigénio N que o vírus selvagem existente, mas que não seja dos subtipos H5 ou H7, ou se os subtipos com os mesmos antigénios N já estejam a circular no terreno. Os patos, sobretudo, são portadores de mais de um subtipo. Também houve necessidade de desenvolver um teste adequado que permitisse a monitorização dos bandos por rotina, para detecção de anticorpos antineuraminidase. Em Itália, foi desenvolvido e utilizado um teste serológico *ad hoc* com base num teste de fluorescência de detecção indirecta, utilizando como antigénio proteínas N, expressas por recombinantes de baculovírus. É possível que tenham uma aplicação mais abrangente e fácil quando se desenvolver um teste ELISA.

A utilização de vacinas que contenham apenas HA, tais como vacinas de vector recombinante, permite que os testes AGID clássicos ou os testes ELISA com base em nucleoproteínas, proteínas não estruturais ou proteínas matriz detectem a infecção em aves vacinadas.

No caso das vacinas inactivadas, descreveu-se um teste que detecta anticorpos à proteína não estrutural do vírus que só se produzem durante uma infecção natural. Tal sistema ainda tem de ser validado no terreno, mas é limitado pelo facto de que a infecção natural de um bando com qualquer vírus da gripe, independentemente do subtipo, resulta na produção de anticorpos dirigidos à proteína não estrutural.

O desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis de detecção de vírus, especialmente os que podem ser automatizados, como a RT-PCR em tempo real, significa que poderiam ser usados em testes simples, abrangentes e regulares para detectar a presença de vírus selvagens em aves vacinadas. A detecção dos agentes, no entanto, será limitada a um curto período na fase aguda da infecção e dela não se pode concluir que um bando não esteve anteriormente exposto ao vírus. Esta abordagem é a mais adequada para testar aves vacinadas antes de uma deslocação para demonstrar que estão isentas de infecção activa.

O número de amostras a testar pelos sistemas escolhidos deve permitir a exclusão num bando da prevalência de infecção pelo vírus da GA superior a 15 % com um nível de confiança de 95 %.

CAPÍTULO X

Estratégias para o diagnóstico da GA

Tal como estabelecido no anexo IV da Directiva 2005/94/CE, as decisões no sentido de aplicar medidas em áreas específicas ou em explorações de contacto e a severidade dessas medidas podem variar muito segundo a magnitude do risco. Do mesmo modo, é provável que a confirmação exigida do diagnóstico seja ponderada em função da situação prevalente, da magnitude do perigo e do grau do risco. As autoridades veterinárias devem tomar decisões com base em indícios de diagnóstico conciliando o controlo rápido e a erradicação da doença com o impacto potencial de um diagnóstico errado. Estas decisões têm de ser tomadas tendo em conta muitos factores ao mesmo tempo, mas é possível prever certas situações.

Situação da doença	Problema potencial	Crítérios de diagnóstico
Sinais não específicos, suspeita não oficial	Exploração isolada	Efectuar a detecção rápida com base na RT-PCR do gene M. Diagnóstico diferencial conforme requerido.
Primeira suspeita de surto	Exploração isolada	Efectuar testes de diagnóstico, isolamento e caracterização do vírus.
Primeira suspeita de surto	Exploração numa área com elevada densidade de aves de capoeira	Efectuar testes de diagnóstico, isolamento e caracterização do vírus, mas com particular destaque para os métodos de detecção e caracterização rápidas, especialmente os baseados na RT-PCR e na sequenciação ⁽¹⁾ .
Segunda e subsequentes suspeitas de surto	Explorações isoladas, associadas epidemiologicamente a uma primeira suspeita de surto	Concentração em métodos de detecção e caracterização rápidas, especialmente os baseados na RT-PCR e na sequenciação ⁽¹⁾ .
Segunda e subsequentes suspeitas de surto	Explorações numa área com elevada densidade de aves de capoeira ou com muitas associações epidemiológicas	Basear-se em métodos de detecção rápida que demonstrem os mais precoces indícios da presença de qualquer vírus da GA ⁽¹⁾ .
Muitas suspeitas de surtos ou propagação rápida da doença, incluindo vigilância	A propagação tornar-se-á incontroável sem uma intervenção rápida	Basear-se em métodos de detecção rápida que demonstrem os mais precoces indícios da presença de qualquer vírus da GA ou basear-se em sinais clínicos ⁽¹⁾ .

⁽¹⁾ Nestes casos, deve efectuar-se uma amostragem completa e as amostras devem ser armazenadas para avaliação posterior.

CAPÍTULO XI

Diagnóstico da infecção com vírus da GA em suínos e outros mamíferos**1. GA nos suínos**

Os vírus da GA infectam rapidamente os suínos e, embora a replicação seja relativamente restrita na maior parte dos casos, é possível que os suínos infectados transmitam a doença a aves de capoeira e a outros animais sensíveis. Até agora, não há provas no terreno de que suínos infectados transmitam os vírus da GA dos subtipos H5 e H7.

A experiência adquirida durante o surto de 2003 nos Países Baixos indicou que os suínos infectados com o subtipo H7N7 não mostraram sinais clínicos que pudessem ser atribuídos à infecção por H7N7. Além disso, aparentemente, não se constataram até agora casos de suínos doentes durante o surto de H5N1 na Ásia, nem noutros locais.

Por conseguinte, os sinais clínicos não são fiáveis para indicarem se os suínos estão infectados, embora possa haver indícios clínicos de infecção nos suínos com outros vírus da gripe de origem aviária assim que um vírus se adapta ao hospedeiro. O diagnóstico das infecções com vírus da GA em suínos é essencialmente semelhante ao diagnóstico em espécies avícolas, com base no isolamento dos vírus, técnicas moleculares e detecção de anticorpos específicos utilizando teste de inibição da hemaglutinação. Existem, contudo, algumas diferenças e nenhum dos testes está totalmente validado para utilização em suínos para confirmar a infecção com vírus da GA.

2. Amostras para o isolamento do vírus

As infecções com os vírus da GA em suínos limitam-se geralmente às vias respiratórias, devendo as amostras consistir em tecidos das vias respiratórias e, se adequado, em esfregaços orofaríngeos ou nasais, retirados de preferência de suínos que mostrem sinais da doença. Tais amostras e esfregaços devem ser tratados para isolamento do vírus ou detecção molecular do vírus, utilizando as mesmas técnicas descritas anteriormente no caso das amostras retiradas de aves. No entanto, ao usar as técnicas de PCR, devem ser feitos controlos apropriados para assegurar que a amplificação não é inibida por substâncias presentes nas amostras retiradas de suínos.

3. Inoculação e incubação dos ovos

Para isolar os vírus da gripe de mamíferos em ovos de galinhas embrionados entre 9 e 11 dias de idade, é prática corrente inocular cada ovo através da cavidade alantóica na cavidade amniótica. No entanto, ao testar os suínos em contacto com vírus da GA quando os vírus tiveram pouca oportunidade para se adaptarem, a inoculação da cavidade alantóica é provavelmente suficiente.

Do mesmo modo, 35°C é geralmente a temperatura de incubação recomendada para o isolamento dos vírus da gripe do tipo A em mamíferos, mas, mais uma vez, no caso de vírus pouco adaptados aos suínos, 37°C não é prejudicial para o isolamento do vírus.

4. Teste para detecção de anticorpos específicos em testes HI

O isolamento dos vírus ou a detecção molecular são provavelmente os métodos mais sensíveis para determinar a presença de infecções com o vírus da GA em suínos. No entanto, foram detectadas reacções serológicas em suínos na ausência do isolamento ou da detecção do vírus. Os testes HI com soros de suíno requerem algumas modificações dos testes usados com os soros de aves referidos no capítulo VIII.

Os soros dos suínos são conhecidos pela sua propriedade de inibição não específica nos testes HI e, como tal, para impedir que isto ocorra, cada amostra de soro deve ser tratada com uma enzima que destrua os receptores (RDE). Utilizar-se-á o seguinte método:

- a) Adicionar 400 µl de RDE (diluição de trabalho pré-determinada) a 100 µl de anti-soro de suíno e misturar bem.
- b) Incubar a 37°C durante uma hora.
- c) Depois incubar durante 30 minutos a 56°C.
- d) Arrefecer as amostras a 4°C durante 15 minutos, no mínimo.
- e) Adicionar 10 µl de eritrócitos de pinto a 30 % (v/v de concentrado de eritrócitos) e misturar vigorosamente.
- f) Incubar a 4°C durante a noite. Em alternativa, se for essencial utilizar amostras no mesmo dia, incubar a 37°C durante uma hora e centrifugar a 300 x g durante cinco minutos.

O soro tratado é depois utilizado nos testes HI, tal como descritos relativamente aos soros aviários no ponto [...], sendo a diluição inicial de 1:10. Deve ser usado um conjunto de soros de suíno, com um estatuto seronegativo conhecido no que se refere à GA, a fim de avaliar a especificidade do teste HI relativamente à estirpe do vírus utilizada (ver utilização da estirpe do vírus derivada do surto para efeitos de serologia — capítulo VIII). Durante o surto nos Países Baixos em 2003, foram detectados 2,6 % de reactivos não específicos no teste HI utilizando soros de suíno, colhidos independentemente do surto.

5. Amostragem de suínos

Especialmente em explorações que mantêm suínos e aves de capoeira, em conjunto ou em instalações separadas, os suínos correm o risco de ficar infectados com GA directa ou indirectamente através do contacto com aves de capoeira ou respectivos produtos. Para excluir essa infecção, é necessário colher esfregaços orofaríngeos ou nasais e amostras de sangue, de acordo com os procedimentos descritos no ponto 8.21 do capítulo IV. As amostras devem ser obtidas de suínos que mostram sinais clínicos da doença. No entanto, quando não mostram quaisquer sinais clínicos, podem ser colhidas amostras aleatoriamente em todas as secções da instalação. Se o laboratório tiver capacidade para tal, os esfregaços devem ser testados por testes moleculares rápidos e/ou por isolamento do vírus. A RT-PCR deve ter sido devidamente validada e ter uma sensibilidade pelo menos equivalente ao isolamento do vírus em ovos relativamente aos vírus da gripe do tipo A.

Duas a quatro semanas depois do abate das aves de capoeira infectadas com a GA, devem ser colhidas pelo menos 60 amostras de sangue de suínos, de modo a que pelo menos algumas amostras sejam obtidas de grupos de suínos que estão em contacto directo uns com os outros. As amostras devem ser testadas com o teste HI utilizando vírus derivados do surto entre as aves de capoeira. As amostras, quer da fase aguda quer da fase de convalescença, devem ser testadas com o mesmo teste. As amostras positivas podem ser confirmadas utilizando a neutralização do vírus e/ou análises «Western blot».

Se qualquer uma destas amostras se revelar positiva, deve ser efectuada uma investigação epidemiológica em todas as explorações de suínos localizadas na zona de protecção, independentemente de serem ou não de tipo misto.

6. Vírus da GA noutros mamíferos além dos suínos

Devem ser realizadas investigações noutros mamíferos, que não suínos, que sejam sensíveis à GA, incluindo gatos. Especificamente no que se refere à GAAP H5N1, os gatos devem ser testados da seguinte forma:

Retirar amostras para investigações virológicas de preferência dos pulmões e do fígado de animais mortos, dado que as grandes lesões patológicas, associadas à replicação vírica, concentram-se nestes órgãos. Nos animais vivos, retirar de preferências esfregaços de traqueia/orofaríngeos para detecção vírica. Também podem retirar-se, separadamente, esfregaços fecais.

As amostras de sangue a examinar nos ensaios HI requerem um tratamento térmico a 56°C durante 30 minutos, podendo omitir-se o tratamento com RDE.

CAPÍTULO XII

Requisitos mínimos de segurança para o transporte de amostras

1. O transporte de amostras nas quais se suspeita ou está confirmada a presença de agentes patogénicos está sujeito a regulamentações nacionais e internacionais rigorosas que devem ser permanentemente observadas. Os isolados dos vírus não são classificados como amostras de diagnóstico, mas devem ser embalados em conformidade com normas internacionais.

As instruções estabelecidas no presente capítulo aplicam-se ao transporte aéreo, mas deve ser utilizado um acondicionamento semelhante no transporte de amostras por via terrestre ou marítima.

2. Acondicionamento de amostras de diagnóstico para transporte

Às amostras de diagnóstico transportadas de acordo com a regulamentação da IATA é atribuído o número de identificação da ONU 2814, 2900 ou 3373, conforme adequado.

Até a embalagem chegar ao destinatário, o responsável pela expedição é o expedidor e não a companhia de transporte.

3. Embalagem primária

- a) Os recipientes primários devem ser estanques, devendo, por exemplo, as tampas de rosca ser seladas com parafilme ou fita adesiva ou uma protecção semelhante;
- b) Os recipientes primários múltiplos devem ser embalados individualmente para impedir que se partam;
- c) Ao determinar o volume das amostras de diagnóstico a expedir, o meio de transporte dos vírus deve ser tomado em conta;
- d) O(s) recipiente(s) primário(s) não pode(m) conter mais de 500 ml ou 500 g.

A amostra de diagnóstico é constituída pelo conteúdo total do recipiente primário.

4. Embalagem secundária

- a) Deve ser utilizado material absorvente suficiente no contentor secundário para absorver o conteúdo total de todos os recipientes primários em caso de derrame ou dano;
- b) As embalagens secundárias devem respeitar os requisitos de embalagem da IATA para as amostras de diagnóstico, incluindo o procedimento do ensaio de queda de uma altura de 1,2 m (3,9 pés). Dado que as embalagens de substâncias infecciosas estão sujeitas a requisitos mais rigorosos do que os aplicáveis às embalagens de amostras de diagnóstico, pode ser utilizada a instrução de embalagem 602 da IATA;

- c) As embalagens contendo substâncias infecciosas devem ostentar as marcações específicas exigidas na embalagem («UN» encontrar-se-á dentro de um círculo); por exemplo:

«UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450»;

- d) As embalagens secundárias devem ser estanques. Devem ser respeitadas as instruções de embalagem emitidas pelo fabricante das embalagens ou por outra parte autorizada, incluídas nas embalagens secundárias;
- e) As embalagens secundárias devem ter, pelo menos, 100 mm (4 polegadas) na menor dimensão exterior fora a fora;
- f) As embalagens secundárias devem ser suficientemente amplas para incluir os documentos de expedição, tais como a carta de porte aéreo.

5. Embalagem exterior

- a) A embalagem exterior não deve conter mais de 4 l ou 5 kg;
- b) Se for necessário, deve ser colocado gelo seco ou gelo triturado à volta da embalagem secundária. Se for utilizado gelo seco, a embalagem deve permitir a libertação do dióxido de carbono e não permitir uma acumulação de pressão susceptível de causar o rompimento da embalagem. Se se utilizar gelo triturado, a embalagem deve ser estanque.

Cada embalagem e a carta de porte aéreo devem ser marcadas com a seguinte menção exacta:

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

- c) Deve ser colocada entre a embalagem secundária e a embalagem exterior uma lista detalhada do conteúdo;
- d) A embalagem exterior deve ser colocada num saco de plástico selado para a proteger da humidade;
- e) Não é necessária a declaração do expedidor para as mercadorias perigosas.

CAPÍTULO XIII

Expedição de vírus e de amostras para o laboratório comunitário de referência

1. As amostras a enviar ao laboratório comunitário de referência devem cumprir as recomendações para o transporte de agentes patogénicos perigosos aplicáveis na Comunidade e também as regulamentações e a legislação em vigor no Reino Unido.

As instruções contidas no presente capítulo devem ser respeitadas.

2. Expedição de vírus e de outros materiais para o laboratório comunitário de referência

- a) Todos os materiais devem estar embalados em conformidade com as instruções indicadas no presente capítulo;
- b) A embalagem exterior deve estar marcada com a seguinte menção:

«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.»;

- c) Deve ser inserido um dos seguintes números de licença:

- i) para todos os vírus da GA: «AHZ/2232/2002/5*»;
- ii) para tecidos e outros materiais: «AHZ/2074C/2004/3*»;

Dado que estes números de licença são alterados de vez em quando, os laboratórios que enviam amostras devem assegurar-se de que usam os números de licença actualizados antes de enviar as embalagens;

d) A embalagem deve ser endereçada a:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
Reino Unido

e) A embalagem deve ser acompanhada de uma carta com o maior número de informações possível sobre os isolados, tais como a espécie e a idade, área/país de isolamento e qualquer historial clínico disponível;

f) As embalagens devem ser expedidas por correio aéreo ou carga aérea.

Se as embalagens forem enviadas por carga aérea, o número da carta de porte aéreo deve ser indicado ao laboratório comunitário de referência por fax, telefone ou correio electrónico antes da chegada dos materiais.

As embalagens enviadas por carga aérea devem ser claramente marcadas com a seguinte menção:

«CARE OF TRANSGLOBAL» para garantir um tratamento rápido no aeroporto.

Contactos do laboratório comunitário de referência

Ian H. Brown, Director do Laboratório de Referência

Telefone directo: (44-1932) 35 73 39;

Fax. directo: (44-1932) 35 72 39;

Email: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, Responsável pelo Laboratório de Referência

Telefone directo: (44-1932) 35 77 36 ou (44-1932) 35 77 08

Fax. directo: (44-1932) 35 78 56

Email: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

CAPÍTULO XIV

Requisitos mínimos de segurança para os laboratórios de diagnóstico da GA

1. Os requisitos de segurança nos laboratórios de diagnóstico que trabalham com os vírus da GA devem abranger quer o confinamento dos vírus que constituem uma ameaça para a sanidade animal, quer a protecção daqueles que trabalham no laboratório (e fora dele) contras os riscos zoonóticos.

Na Comunidade, os requisitos de segurança mínimos aplicáveis aos laboratórios estão fixados em várias directivas. Além disso, os aspectos operacionais estão descritos e estabelecidos em normas europeias subjacentes. Para o funcionamento dos laboratórios para efeitos de diagnóstico, existem outras regulamentações (EN), tais como boas práticas de laboratório.

2. Directivas comunitárias relativas aos laboratórios

Directiva 89/391/CEE do Conselho, de 12 de Junho de 1989, relativa à aplicação de medidas destinadas a promover a melhoria da segurança e da saúde dos trabalhadores no trabalho (JO L 183 de 29.6.1989, p. 1).

Directiva 90/679/CEE do Conselho, de 26 de Novembro de 1990, relativa à protecção dos trabalhadores contra os riscos ligados à exposição a agentes biológicos durante o trabalho (sétima Directiva especial na acepção do n.º 1 do artigo 16.º da Directiva 89/391/CEE) (JO L 374 de 31.12.1990, p. 1).

Se for feito um diagnóstico por reacção em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem de produtos PCR num plasmídeo bacteriano para propagação, por exemplo para efeitos da sequenciação do ADN, além das duas directivas atrás referidas, aplicam-se a seguinte directiva e as normas europeias (EN) abaixo indicadas:

Directiva 90/219/CEE do Conselho, de 23 de Abril de 1990, relativa à utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados (JO L 117 de 8.5.1990, p. 1).

3. Além das directivas comunitárias, as normas europeias (EN) devem ser respeitadas:

EN 12128 Biotecnologia. Laboratórios de investigação, desenvolvimento e análises. Níveis de confinamento de laboratórios de microbiologia, áreas de risco, locais e requisitos físicos de segurança.

EN 12738 Biotechnology. Laboratories for research, development and analysis. Guidance for containment of animals inoculated with micro-organisms in experiments.

EN 12740 Biotecnologia. Laboratórios de investigação, desenvolvimento e análises. Guia para o manuseamento, a inactivação e o controlo de resíduos.

EN 12741 Biotecnologia. Laboratórios de investigação, desenvolvimento e análises. Guia para operações em laboratórios de biotecnologia.

Para o funcionamento e a gestão de um laboratório, aplicam-se as seguintes condições:

4. Requisitos aplicáveis aos laboratórios (níveis de confinamento 1 a 4)

Em conformidade com a **Directiva 2000/54/CE** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Setembro de 2000, relativa à protecção dos trabalhadores contra riscos ligados à exposição a agentes biológicos durante o trabalho (sétima directiva especial, na acepção do n.º 1 do artigo 16.º da Directiva 89/391/CEE) (JO L 262 de 17.10.2000, p. 21), a Directiva 90/219/CE e as normas europeias: EN 12128; EN 12740; EN 12741.

Medidas de confinamento	Nível de confinamento			
	1	2	3	4
Sala laboratorial: isolamento	não	sim	sim	sim
Laboratórios separados por portas	não	sim	sim	sim
Existência de uma janela de observação ou equivalente que permita ver os ocupantes	facultativo	facultativo	facultativo	sim
Instalações para a lavagem das mãos do pessoal	sim	sim	sim	sim
Instalações de desinfecção (mãos)	facultativo	sim	sim	sim
Acesso restrito	não	sim	sim	sim
Medidas específicas para o controlo da disseminação de aerossóis	não	sim minimizar	sim evitar	sim evitar
Aviso de bio-risco na porta	não	sim	sim	sim
Chuveiro	não	não	facultativo	sim
Lava-olhos	sim	sim	sim	sim
Laboratório: possibilidade de selagem para fumigação	não	não	sim	sim
Superfícies resistentes a água, ácidos, bases, solventes, desinfectantes e agentes de descontaminação e que sejam fáceis de limpar	sim (bancada)	sim (bancada)	sim (bancada, pavimento)	sim (bancada, pavimento)
Acesso ao laboratório através de câmara intermédia	não	não	facultativo	sim
Pressão negativa em relação à pressão do ambiente circundante	não	não	facultativo	sim
O ar extraído e de alimentação no laboratório deve ser objecto de filtração HEPA	não	não	sim (ar extraído)	sim
Autoclave	na área	no edifício	num compartimento anexo ao laboratório	no laboratório, com duas saídas

Medidas de confinamento	Nível de confinamento			
	1	2	3	4
Vestuário de protecção	vestuário de protecção adequado	vestuário de protecção adequado	vestuário de protecção adequado (calçado facultativo)	mudança total de vestuário
Luvas	não	facultativo	sim	sim
Controlo eficaz dos vectores (por exemplo, roedores e insectos)	facultativo	sim	sim	sim
Armazenamento seguro de um agente biológico	sim	sim	sim	sim
O laboratório deve confinar o seu próprio equipamento	não	não	recomendado	sim

Existem mais normas europeias que tratam a gestão e a organização dos laboratórios.

Existem outras regulamentações e recomendações nacionais e internacionais que devem ser respeitadas. A OMS publicou a 3.ª edição do Manual de Biossegurança em Laboratório no seguinte sítio *web*:

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

5. Confinamento relacionado com a sanidade animal

As regulamentações respeitantes ao confinamento dos vírus da GA, especialmente da GAAP, mas incluindo todos os vírus da GA de subtipo H5 e H7, devem ser postas em prática pelas autoridades veterinárias nos Estados-Membros. O Gabinete Internacional de Epizootias (OIE) dá algumas orientações no capítulo 1.4.5 do Código Sanitário dos Animais Terrestres de 2005, sendo a GAAP considerada como um agente patogénico do grupo de confinamento 4.

No entanto, as regulamentações que regem o manuseamento dos vírus da GA serão postas em prática pelas autoridades veterinárias dos Estados-Membros.

Os requisitos mínimos de segurança aplicados pelo laboratório comunitário de referência, que constituem as regras nacionais do Reino Unido, podem ser consultados no seguinte sítio *web*:

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

6. Confinamento relacionado com a saúde humana

Os laboratórios que trabalham com os vírus da GA devem estar sempre conscientes de que se trata, pelo menos, de potenciais agentes patogénicos para o ser humano e devem gerir o funcionamento do laboratório evitando infectar aqueles que trabalham no laboratório e qualquer fuga dos vírus para o exterior.

As orientações para o manuseamento de amostras que se suspeitem conterem o vírus da GA de tipo A podem ser consultadas no sítio *web* da Organização Mundial de Saúde (OMS):

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