

RESOLUCIÓN SENASA 1078/99

POLICIA SANITARIA - AVE - INFLUENZA AVIAR - MANUAL DE PROCEDIMIENTO

Incorpora al artículo 4° del Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales a la Influenza Aviar Altamente Patógena. Reglamento de denuncias. Procedimientos de SENASA.

RESOLUCION N° 1078/99 SENASA

BUENOS AIRES, 27 de setiembre de 1999

VISTO el expediente N° 9617/99 del registro del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, en el cual la Dirección Nacional de Sanidad Animal, propone dictar normas de prevención, profilaxis y la vigilancia epidemiológica de la Influenza Aviar Altamente Patógena, y

CONSIDERANDO:

Que la Influenza Aviar Altamente Patógena es una de las enfermedades que afectan a las aves que se caracteriza por su alta morbilidad y mortandad y su capacidad para producir grandes pérdidas económicas en las producciones avícolas.

Que es necesario que la REPUBLICA ARGENTINA adopte oficialmente una definición de la Influenza Aviar Altamente Patógena, a fin de armonizar conceptos sobre la misma, acorde con los enunciados por la OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE).

Que a fin de establecer pautas claras de acción frente a la posible aparición de la enfermedad en el país, resulta necesario incorporar la Influenza Aviar Altamente Patógena, como enfermedad exótica, al Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales del 8 de noviembre de 1906 de la Ley N° 3959.

Que es menester establecer medidas de control a nivel Nacional que deberán ser adoptadas ante la posibilidad de que se detecte un foco o sospecha de la presencia de Influenza Aviar Altamente Patógena en el país.

Que ante la posible aparición de un foco de la enfermedad, es factible tomar medidas estrictas de control y erradicación eficaces, que impidan su propagación.

Que es responsabilidad del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA establecer medidas de control de las enfermedades de las aves, contribuyendo así al desarrollo de la producción y garantizar la sanidad de los productos y subproductos avícolas que de esta manera podrán acceder a nuevos mercados del mundo.

Que la Dirección de Asuntos Jurídicos ha dictaminado al respecto, no encontrando reparos de orden legal que formular.

Que el Consejo de Administración ha tomado la intervención que le compete.

Que el suscripto es competente para resolver en esta instancia, en virtud de lo estipulado en el artículo 8°, inciso h) del Decreto N° 1585 de fecha 19 de diciembre de 1996.

Por ello,

**EL PRESIDENTE DEL SERVICIO NACIONAL DE
SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
RESUELVE:**

ARTICULO 1°.- Incorpórase al artículo 4° del Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales del 8 de noviembre de 1906 de la Ley N° 3959 a la Influenza Aviar Altamente Patógena.

ARTICULO 2°.- La REPUBLICA ARGENTINA adopta la siguiente definición de Influenza Aviar Altamente Patógena: "Es una infección de las aves, producida por cualquier virus de la influenza aviar A, cuyo índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) sea superior a UNO COMA DOS (1,2) en pollitos de SEIS (6) semanas de edad, o cualquier infección provocada por virus del subtipo H5 o H7 de la Influenza A cuya secuenciación de nucleótidos haya demostrado la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la hemoaglutinina".

ARTICULO 3°.- Los profesionales veterinarios, propietarios, o personas responsables o encargadas de cualquier explotación avícola, industrial o doméstica, de aves de corral o aves ornamentales o de compañía, que detecten en las aves a su cargo signos de enfermedad o resultados de laboratorio, compatibles con la Influenza Aviar Altamente Patógena, deberán obligatoriamente y en forma inmediata realizar la denuncia al SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.

ARTICULO 4°.- Las denuncias a las que se refiere el artículo precedente serán recepcionadas en las Oficinas Locales de las Direcciones Regionales más próximas al establecimiento o en forma telefónica u otra a la sede Central del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.

ARTICULO 5°.- Ante la denuncia de un foco de Influenza Aviar o sospecha de la misma, el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica comunicará la alerta al Sistema de Emergencias Sanitarias a fin de que se extremen las medidas de vigilancia en todo el país y de que se implementen las medidas que a continuación se detallan:

- a) Interdicción del establecimiento o local y de los establecimientos o locales vecinos si por razones geográficas o de contacto se justificara.
- b) Censo de todas las aves del establecimiento o local (vivas, muertas y enfermas).
- c) Toma de muestras y envío al laboratorio Oficial de acuerdo a las normas técnicas que se detallan en el Anexo de la presente resolución.
- d) Aislamiento de todas las aves de manera de garantizar que no tomen contacto con otras aves.
- e) Prohibición de ingreso de otras aves y salida de las que se encuentran en el lugar.
- f) Los movimientos o traslados de personas, animales, vehículos, alimentos, residuos, o cualquier elemento capaz de transmitir la enfermedad, estarán subordinados a la autorización del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA o a la de las personas que el Servicio Nacional designe.
- g) Desinfección de las entradas y salidas del establecimiento o local y de las instalaciones que se encuentren en el mismo con los desinfectantes autorizados oficialmente para tal fin.

ARTICULO 6°.- Si se confirmara por las pruebas de laboratorio, el diagnóstico de Influenza Aviar Altamente Patógena, el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA adoptará las siguientes medidas:

- a) Delimitación de una "zona de foco" de un radio mínimo de CINCO (5) kilómetros rodeada de una "zona de vigilancia" de un mínimo de DIEZ (10) kilómetros de radio.
- b) Sacrificio "in situ" de todas las aves afectadas en el establecimiento o local y destrucción de los cadáveres, huevos y residuos (guano, cama de galpón, etc.) de acuerdo con las normas técnicas que se detallan en el Anexo de la presente resolución.
- c) Limpieza y desinfección de las instalaciones y sus alrededores, implementos, vehículos de transporte y de todo material que pueda estar contaminado utilizando para tal fin técnicas y desinfectantes autorizados oficialmente.
- d) Establecimiento de un período de espera o descanso de por lo menos VEINTIUN (21) días antes de autorizar la introducción de nuevas aves al lugar.
- e) Seguimiento y destrucción de las carnes de aves y huevos para consumo o para incubación que provengan del establecimiento afectado y que hubieran salido del mismo en el supuesto período de incubación de la enfermedad.
- f) En la zona de foco se aplicarán las siguientes medidas:
 - f.1) Localización de todas las explotaciones avícolas o locales en los que se encuentren aves.

- f.2) Visitas y examen clínico y/o de laboratorio, si fuera necesario, a todos los establecimientos.
- f.3) Desinfección adecuada de todas las entradas y salidas de esos lugares.
- f.4) Control de tránsito dentro de la zona, de aves, de las personas que trabajen con las mismas, vehículos, cadáveres, huevos.
- f.5) Los movimientos de aves para faena, huevos para incubar o para consumo y aves de un día, se realizarán únicamente bajo la autorización del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, o de las personas que este Servicio Nacional designe.
- f.6) En caso de transporte para faena, el Veterinario Oficial del establecimiento faenador deberá estar advertido de la llegada de esas aves para proceder a un sacrificio apartado de otras aves y para la identificación de la carne procedente de las mismas.
- f.7) Las aves de UN (1) día o huevos para incubación podrán ser transportadas de preferencia a establecimientos dentro de la zona del foco o de vigilancia o a un establecimiento con control oficial.
- f.8) Los huevos para consumo podrán ser transportados preferiblemente a un establecimiento elaborador de ovoproductos, o deberán ser identificados para su comercialización dentro de la zona de foco o de vigilancia, o en otra zona previa desinfección de los mismos.
- f.9) No habiéndose registrado otras novedades, las medidas de la "zona de foco" se mantendrán durante VEINTIUN (21) días como mínimo a partir del día en que se realizó la desinfección del establecimiento, a partir de ese momento, la zona de foco pasará a formar parte de la "zona de vigilancia".
- g) En la "zona de vigilancia" se dispondrán las siguientes medidas:
- g.1) Localización de todas las explotaciones avícolas o locales en los que se encuentren aves.
- g.2) Control de los desplazamientos y traslados dentro de la zona.
- g.3) En lo referente a las aves que se trasladen a faena, y a los huevos para incubación, podrán ser trasladados con autorización del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA y habiéndose avisado previamente al Veterinario Oficial del establecimiento de destino que deberá realizar en el caso de las carnes, la identificación correspondiente. Los huevos para incubación deberán ser desinfectados antes de su traslado.
- g.4) Los huevos para consumo podrán ser transportados preferiblemente a un establecimiento elaborador de ovoproductos, o deberán ser identificados para su comercialización dentro de la zona del foco o de vigilancia, o en otra zona previa desinfección de los mismos.
- g.5) De no haberse registrado novedades, las medidas adoptadas en la "zona de vigilancia", se mantendrán durante un período de TREINTA (30) días como mínimo, a partir de haberse realizado la desinfección en el establecimiento infectado.
- h) Tanto en la zona de foco como en la zona de vigilancia, y en los períodos durante los cuales se mantengan las medidas antes descritas, estará prohibido la realización de ferias, exposiciones o mercados en los cuales se concentren aves de corral u otras.

ARTICULO 7°.- EI SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA garantizará que se realice la investigación epidemiológica correspondiente a fin de poder establecer en lo posible el origen de la infección inicial, el tiempo transcurrido desde el ingreso

del agente etiológico hasta la aparición de los síntomas, los posibles contactos establecidos entre las aves afectadas y otras y/o personas, a fin de extremar las medidas de control y de difusión de la enfermedad.

ARTICULO 8°.- Las pruebas de laboratorio, así como la extracción de muestras para el diagnóstico de la Influenza Aviar Altamente Patógena se realizarán de acuerdo a las técnicas establecidas y detalladas en el Anexo de la presente resolución. La Dirección de Laboratorios y Control Técnico del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA podrá recurrir, de evaluarlo necesario, a la remisión de muestras a los laboratorios de referencia internacional para la Influenza Aviar Altamente Patógena a fin de obtener la colaboración correspondiente en el diagnóstico de la enfermedad.

ARTICULO 9°.- El SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA evaluará la necesidad de implementar un plan de vacunación de las aves de corral u otras, en explotaciones o locales que se encuentren o no en las zonas afectadas y delimitadas según el artículo 6° de la presente resolución.

ARTICULO 10.- Autorízase a la Dirección Nacional de Sanidad Animal del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, a dictar normas complementarias a la presente resolución a fin de ajustar y adecuar las medidas de control y erradicación expuestas en la misma.

ARTICULO 11.- El SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA comunicará en forma inmediata a la OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E.) y a los estados miembros del MERCADO COMUN DEL SUR (MERCOSUR), las novedades registradas en la REPUBLICA ARGENTINA referentes a la Influenza Aviar Altamente Patógena y a la evolución de las mismas mediante un informe técnico completo y detallado sobre los hechos registrados y las medidas implementadas.

ARTICULO 12.- Los infractores a la presente resolución serán pasibles de ser sancionados con las penalidades previstas en el artículo 18 del Decreto N° 1585 del 19 de diciembre de 1996.

ARTICULO 13.- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese.

Fdo.: Luis O. BARCOS - Presidente

ANEXO

1. APLICACION DEL SACRIFICIO SANITARIO EN UNA EXPLOTACION AVICOLA INFECTADA DE INFLUENZA AVIAR

1. 1. El sacrificio de las aves se realizará dentro de la misma explotación infectada o lo más cerca posible, preferentemente en horas de luz adecuada.

1. 1.1. Se deberá evitar que se escapen animales.

1.2. Primero se sacrificarán todas aquellas aves que presentaban signos clínicos y luego las que no presentaron signos clínicos pero que estuvieron en contacto riesgoso con las otras.

1.3. La técnica de eutanasia será acordada con el personal técnico del establecimiento, de acuerdo a las posibilidades prácticas que se presenten.

1.4. Los restos serán cubiertos por desinfectantes adecuados, protegidos de animales predadores, para luego poder ser destruidos. Toda la ropa y calzado de los operarios deberá ser dejada en el lugar del foco hasta la limpieza y desinfección.

2. ELIMINACION DE LOS CADAVERES, MATERIALES Y RESIDUOS.

Para la eliminación de las carcazas, vísceras, estiércol y alimentos, se podrá realizar.

2.1. ENTIERRO: Los lugares para el entierro deberán contar con la aprobación de los reglamentos locales y oficiales encargados de la protección del medio ambiente. Las fosas de entierro deberán ser calculadas con una profundidad suficiente para permitir ser recubiertas con un metro de tierra. No se aplicará cal a las carcazas salvo que el suelo sea muy húmedo. No se asentará la tierra al recubrir la fosa.

2.2. INCINERACION: Se recurrirá a la incineración cuando no se pueda realizar el entierro. Se deberá considerar la topografía del lugar, dirección de los vientos, presencia de instalaciones u objetos de fácil combustión, disponibilidad de combustible y materiales que ayuden a la combustión, aprobación de los organismos oficiales encargados de la protección del medio ambiente, disponibilidad de agua o material contra incendio.

3. PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCION DE UNA EXPLOTACION AVICOLA INFECTADA DE INFLUENZA AVIAR

Primera limpieza y desinfección:

3.1. Una vez extraídos los cadáveres y restos de alimentos o materia orgánica para su eliminación, se rociarán todas las superficies con las que hayan estado en contacto o cercanas a los mismos, con desinfectantes autorizados por el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. El desinfectante deberá permanecer durante VEINTICUATRO (24) horas como mínimo.

Segunda Limpieza y desinfección:

3.2. Se realizará una limpieza profunda con un producto desengrasante y agua.

3.3. Se rociará nuevamente con desinfectante indicado, todas las superficies tratadas, y se dejarán transcurrir SIETE (7) días.

3.4. Se realizará nuevamente otra limpieza profunda con un producto desengrasante y abundante agua.

3.5. Los implementos, bebederos, comederos, jaulas, nidos, etc. deberán tratarse en forma similar con especial atención al uso de agua caliente o sopleteado que supere los SETENTA GRADOS CENTIGRADOS (70°C). Se ubicarán en un lugar apartado y cubierto al amparo de otros animales o aves durante por los menos CUARENTA Y DOS (42) días.

3.6. Los desagües y conductos de evacuación se llenarán con desinfectantes concentrados.

3.7. El personal que conforma el equipo de limpieza y desinfección deberá ser provisto de ropa protectora adecuada, en lo posible descartable y toda la ropa y calzado deberá ser limpiada y desinfectada al terminar el operativo y ser provisto de ropa y calzado limpio para salir del establecimiento.

4. TOMA DE MUESTRAS Y ENVIO AL LABORATORIO OFICIAL

4.1. Obtener y enviar los antecedentes del establecimiento avícola y zona de foco y remitirla en el formulario que se adjunta por vía fax a la Coordinación de Laboratorio Animal de la Dirección de Laboratorios, y Control Técnico del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.

4.2. Seleccionar el lugar para realizar las necropsias, y proceder a fin de garantizar la bioseguridad de las maniobras en cuanto a vestimenta, eliminación de desechos y desinfección total del área de trabajo.

4.3. Tener frascos y tubos disponibles individualmente rotulados para cada ave muestreada.

4.4. Examinar y obtener muestras en forma aséptica de aves recientemente sacrificadas con distintas etapas de enfermedad clínica, en una cantidad que sea muestra representativa de la población afectada, asignándoles números correlativos a fin de identificar frascos y protocolos de necropsia.

4.5. Tejido frescos para aislamiento viral: pulmón, corazón, hígado, riñón, bazo, cerebro enviado, refrigerado o congelado, colocando distintos órganos del mismo ave en UN (1) frasco. De enviar intestino o contenido intestinal hacerlo en UN (1) frasco aparte identificando el ave.

4.6. Tejido fijado en formalina neutra al DIEZ POR CIENTO (10%) para preparaciones histopatológicas de espesor de pocos milímetros.

4.7. Los protocolos de necropsia deben realizarse al finalizar la misma en otro recinto y enviarse en sobre separado de la caja que contenga las muestras.

4.8. Las muestras deben estar bien cerradas en recipientes herméticos con tapa a rosca y sellados. Asegurarse que las superficies externas se descontaminen adecuadamente.

4.9. De ser el recipiente primario de vidrio deben envolverse en algodón o toallas de papel y colocarse en un recipiente secundario como una lata de pintura.

4.10. En caso de no poder cumplir lo indicado en los puntos 4.2. al 4.9., remitir una cantidad de aves que sea muestra representativa de la población afectada, con sintomatología y recién sacrificadas sin abrir, envueltas individualmente en bolsas de plásticos enviándolas en el menor tiempo posible y refrigerados.

4.11. En todos los casos remitir VEINTE (20) sueros de aves del establecimiento o en su defecto la mayor cantidad posible.

4.12. Asegurar externamente la refrigeración con refrigerantes o hielo seco tanto en la remisión de las muestras obtenidas por necropsia, en las aves enteras y en los sueros. Colocar en recipientes térmicos herméticos y evitar el hielo en bolsas para prevenir la fuga de líquidos.

4.13. Esta caja térmica se colocará en una de cartón, agregándose el sobre que lleva los Protocolos.

4.14. La muestra deberá ser entregada en mano en el Laboratorio por UNA (1) persona responsable con la mayor brevedad debiendo entregarse a UN (1) técnico que lo abra en condiciones de bioseguridad. NO ENVIAR POR CORREO, COMISIONISTA U OTROS.

5. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

5.1. Tratamiento de las muestras

Las muestras de materias fecales y el pool de los órganos citados en TOMA DE MUESTRAS (bazo, hígado, pulmón, cerebro, etc.) deberán procesarse por separado e izándolos en UN (1) mezclador cerrado o utilizando UN mortero y arena estéril, en un medio con antibióticos para convertirlas en suspensiones en un medio al DIEZ VEINTE POR CIENTO (10-20%) p/v.

Esas suspensiones se dejarán a temperatura ambiente durante DOS (2) horas o más tiempo a

CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4°C) y se clasificarán por centrifugación a OCHOCIENTOS (800) a UN MIL (1000) gramos durante DIEZ (10) minutos.

El medio de antibióticos para materiales fecales debe contener DIEZ MIL (10.000) unidades/mililitros de penicilina, DIEZ (10) miligramos/mililitros de estreptomicina, CERO CON VEINTICINCO (0,25) miligramos/mililitros de gentamicina y CINCO MIL (5000) unidades/mililitros de micostatina en solución amortiguadora de fosfatos. En tejidos puede reducirse hasta CINCO (5) veces la concentración. Para evitar el crecimiento de Chlamydia, puede añadirse CINCUENTA (50) miligramos/mililitros de oxitetraciclina. El pH después de agregado los antibióticos debe ser de SIETE COMA CERO (7,0) a SIETE COMA CUATRO (7,4).

5.2. Aislamiento del virus en huevos embrionados de gallina:

Deberá inocularse dosis de CERO CON UNO (0,1) a CERO CON DOS (0,2) mililitros del líquido a sobrenadante dentro de la cavidad alantoidea de al menos CUATRO (4) huevos embrionados de gallina que hayan sido incubados de OCHO (8) a DIEZ (10) días. Es preferible que los huevos provengan de una parvada exenta de patógenos específicos (SPF), aunque si ello no fuera posible, podrá utilizarse huevos de una parvada exenta de anticuerpos del virus de Influenza Aviar. Los huevos inoculados deberán mantenerse a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37°C) y se mirarán al trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muerto o moribundos servirán refrigerados a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4°C) a medida que se vayan comprobando. Los demás serán colocados a la misma temperatura SEIS (6) días después de la inoculación.

Los fluidos alantoideos amnióticos se someterán a la prueba de hemoaglutinación (técnica descrita en el Anexo de la Resolución N° 683 del 31 de octubre de 1996 del ex SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL). Si ésta resulta negativa debe repetirse con fluido no diluido.

Cuando la hemoaglutinación sea positiva, deberá descartarse la presencia de bacterias mediante la realización de cultivo. Si se confirma la presencia de bacterias, podrán filtrarse los fluidos con filtro de membrana CUATROCIENTOS CINCUENTA (450) milímetros, añadirse más antibióticos e inocularse en huevos embrionados.

5.3. Diagnóstico diferencia con enfermedad de Newcastle:

Los fluidos hemoaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de hemoaglutinación con un antisuero policlonal específico para el virus de la enfermedad de Newcastle para descartar la citada enfermedad.

5.4. Confirmación:

De no producirse la inhibición de la hemoaglutinación ante sueros de Newcastle se confirmará que el microorganismo es un virus Influenza A utilizando: una prueba de inmunodifusión doble en agar (a) usando como antígeno las membranas corioalantoideas cosechadas de los huevos inoculados, para detectar el antígeno de grupo confrontando el aislamiento a un antisuero anti influenza Tipo A.

Determinar si el virus aislado es del subtipo H5 o H7 por una inhibición de la hemoaglutinación positiva (b) utilizando antisuero policlonal específico para los subtipos H5 y H7.

5.5. Tipificación y caracterización.

Las muestras que resultaran positivas se derivarán a laboratorios internacionales de referencia.

5.6. Pruebas serológicas:

Como la enfermedad es exótica y se desconoce el subtipo que puede aparecer se utilizará la

prueba de inmunodifusión doble en agar para detectar, si se presentan, anticuerpos dirigidos a antígenos específicos de grupo.

Deberán tomarse muestras de sangre de todas las aves cuando el lote esté compuesto de menos de VEINTE (20) animales y muestra de VEINTE (20) aves cuando el lote sea mayor (de este modo, la posibilidad de detectar al menos UN (1) suero positivo será de NOVENTA Y NUEVE POR CIENTO (99%) si el VEINTICINCO POR CIENTO (25%) o más de la manada es positivo independientemente del tamaño de ésta). Para la prueba, deberá dejarse que la sangre se coagule y se extraerá el suero. Se procederá como se indica en (a).

a. Inmunodifusión doble en gel de agar:

Este método permite determinar:

- La presencia del virus de Influenza Aviar A al demostrar la existencia de antígenos de la nucleocápside o de la matriz. A tal fin se usa como antígenos las membranas corioalantoideas infectadas de los huevos inoculados cuyo fluido alantoideo haya resultado positivo a la hemoaglutinación, negativo al control bacteriológico y a la inhibición de la hemoaglutinación con un suero contra Enfermedad de Newcastle.
- El control serológico cuando se desconoce el subtipo de Influenza A contra el que se quiere detectar anticuerpos.

En ambos casos se utilizará agarosa o agar al UNO POR CIENTO (1%) que contenga un OCHO POR CIENTO (8%) de cloruro sódico en una solución amortiguadora de fosfato CERO COMA UNO (0,1) M de ph 7.2.

Queda confirmada cuando las líneas de precipitación formadas por el antígeno problema y el antígeno positivo conocido, frente al antisuero positivo conocido, se unen para dar una línea de identidad o cuando las líneas de precipitación formadas por el suero problema y el suero positivo conocido, frente al antígeno conocido, se unen para dar una línea de identidad según se utilice para verificar un aislamiento viral o como prueba diagnóstica serológica.

b. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación:

Reactivos:

1. Solución salina isotónica amortiguada de fosfato.
2. Fluido alantoideo que contenga el virus, diluido con solución salina isotónica amortiguadora de fosfatos hasta que contenga CUATRO (4) u OCHO (8) unidades de hemoaglutinación por cada CERO CON CERO VEINTICINCO (0,024) mililitro.
3. Suspensión de hematíes de gallina al UNO POR CIENTO (1%).
4. Suero de pollo control negativo.
5. Suero de pollo control positivo.

Método:

1. Distribuido CERO CON CERO VEINTICINCO (0,025) mililitros de solución isotónica de fosfatos en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (usar pocillos con fondo en V)
2. Introducir CERO CON CERO VEINTICINCO (0,025) mililitros de suero en el primer pocillo de la placa.

3. Utilizar UNA (1) micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
4. Añadir CERO CON CERO VEINTICINCO (0,025) mililitros de fluido alantoideo diluido que contenga CUATRO (4) u OCHO (8) unidades de hemoaglutinación.
5. Homogeneizar golpeando ligeramente las placas refrigeradas a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4°C) durante al menos SESENTA (60) minutos o dejarlas a temperatura ambiente durante TREINTA (30) minutos como mínimo.
6. Añadir CERO CON CERO VEINTICINCO (0,025) mililitros de suspensión de hematíes al UNO POR CIENTO (1%) a todos los pocillos.
7. Homogeneizar golpeando ligeramente las placas y refrigerarlas a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4°C).
8. Examinar las placas después de TREINTA (30) a CUARENTA (40) minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrima similar al de los pocillos de control que contengan hematíes CERO CON CERO VEINTICINCO (0,025) mililitros y solución isotónica de fosfatos CERO CON CERO CINCO (0,05) mililitros solamente.
9. El título de inhibición de la hemoaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa a CUATRO (4) u OCHO (8) unidades de virus (en todas las pruebas deberán incluirse una titulación de hemoaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemoaglutinación necesarias).
10. La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de DOS CUBICO (23) para CUATRO (4) unidades de hemoaglutinación o de DOS AL CUADRADO (22) para OCHO (8) unidades de hemoaglutinación con el suero de control negativo y un título que esté entre el doble y la mitad (un orden de difusión) del título conocido del suero de control positivo.

