

Portaria n.º 499/93  
de 12 de Maio

Considerando que a comercialização das aves de capoeira constitui uma fonte de rendimentos importante para a população agrícola;

Considerando que é necessário estabelecer as medidas de luta a aplicar em caso de aparecimento de um foco de gripe aviária na forma altamente patogénica, provocada por um vírus da gripe com características específicas, a seguir designada por gripe aviária, a fim de assegurar o desenvolvimento nacional do sector das aves de capoeira e de contribuir para a protecção da sanidade animal em toda a Comunidade Económica Europeia;

Considerando o Decreto-Lei n.º 175/93, de 12 de Maio, que transpõe para o direito interno a Directiva n.º 92/40/CEE, do Conselho, de 19 de Maio, que estabelece medidas comunitárias de luta contra a gripe aviária;

Considerando a necessidade de estabelecer as normas técnicas de execução do referido diploma;

Ao abrigo do artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 175/93, de 12 de Maio:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, que seja aprovado o Regulamento da Aplicação de Medidas de Controlo da Gripe Aviária em Aves de Capoeira, em anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Ministério da Agricultura.

Assinada em 12 de Março de 1993.

Pelo Ministro da Agricultura, Álvaro dos Santos Amaro, Secretário de Estado da Agricultura.

---

## ANEXO

(a que se refere a Portaria n.º 499/93)

Regulamento da Aplicação de Medidas de Controlo da Gripe Aviária em Aves de Capoeira

Artigo 1.º Sem prejuízo do disposto na lei para o comércio intracomunitário de aves de capoeira, o presente Regulamento define as medidas de controlo a aplicar em caso de aparecimento de um foco de gripe aviária nas aves de capoeira.

Art. 2.º Para efeitos do presente Regulamento, são aplicáveis as definições constantes do artigo 2.º da Directiva n.º 90/539/CEE, do Conselho, de 15 de Outubro, relativa às condições de polícia sanitária que regem o comércio intracomunitário e as importações de aves de capoeira e de ovos para incubação provenientes de países terceiros e, ainda, as seguintes:

a) «Ave de capoeira infectada»: qualquer ave de capoeira:

i) Na qual tenha sido oficialmente confirmada a gripe aviária na aceção do anexo III na sequência de um exame efectuado por um laboratório autorizado;

ii) Na qual se verifiquem sintomas clínicos ou lesões post mortem correspondentes à gripe aviária no caso de um segundo foco ou focos subsequentes;

b) «Ave de capoeira suspeita de estar infectada»: qualquer ave de capoeira que apresente sintomas clínicos ou lesões post mortem que permitam suspeitar da presença de gripe aviária, ou em que tenha sido confirmada a presença do vírus A da gripe dos subtipos H5 ou H7;

c) «Ave de capoeira suspeita de estar contaminada»: qualquer ave de capoeira que possa ter estado exposta, directa ou indirectamente, ao vírus da gripe aviária ou ao vírus A da gripe dos subtipos H5 ou H7;

d) «Autoridade competente»: o Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar (IPPAA) ou a entidade ou serviço em que esta delegue a competência que lhe é atribuída pelo presente diploma;

e) «Veterinário oficial»: o veterinário designado pela autoridade competente.

Art. 3.º Qualquer suspeita de doença de gripe aviária deverá ser obrigatória e imediatamente notificada à autoridade competente pelo proprietário ou criador dos animais.

Art. 4.º - 1 - Quando numa exploração existam aves de capoeira suspeitas de estarem infectadas pela gripe aviária, o veterinário oficial utilizará imediatamente os meios de investigação oficiais para confirmar ou infirmar a presença da referida doença, nomeadamente procedendo ou mandando proceder à colheita de amostras necessárias aos exames laboratoriais.

2 - Logo após a notificação da suspeita, a autoridade competente mandará colocar a exploração sob vigilância oficial e exigirá, nomeadamente, que:

a) Se efectue um registo de todas as categorias de aves de capoeira da exploração, com indicação, relativamente a cada categoria, do número de aves que morreram, das que apresentam sinais clínicos da doença e das que não apresentam qualquer sinal, devendo este registo ser mantido actualizado, por forma a, nomeadamente, ter em conta as aves de capoeira que nasceram e morreram durante o período de suspeita e podendo ser controlado aquando de cada inspecção;

b) Todas as aves de capoeira da exploração sejam mantidas nos seus locais de alojamento ou confinadas a outros locais onde possam estar isoladas e sem contacto com outras aves;

c) Seja proibido qualquer movimento de aves de capoeira provenientes ou destinadas à exploração;

d) Fique subordinado à autorização da autoridade competente:

i) Qualquer movimento de pessoas, de outros animais e de veículos provenientes da exploração ou com destino a ela;

ii) Qualquer movimento de carne ou de carcaças de aves de capoeira, alimentos para animais, material, detritos, dejectos, camas e estrumes, ou tudo o que seja susceptível de transmitir o vírus da gripe aviária;

e) Seja proibida a saída de ovos da exploração, excepto os ovos enviados directamente para um estabelecimento aprovado para o fabrico ou tratamento de ovoprodutos em conformidade com as disposições do n.º 1 do artigo 6.º da Directiva n.º 89/437/CEE, e que sejam transportados nos termos da autorização concedida pela autoridade competente, devendo esta autorização respeitar as exigências previstas no anexo I;

f) Sejam utilizados meios de desinfecção adequados nas entradas e saídas das instalações de alojamento das aves de capoeira, bem como nas da própria exploração;

g) Seja realizado um inquérito epizootiológico em conformidade com o artigo 7.º

3 - O proprietário da exploração ou o criador deve prestar toda a colaboração adequada e necessária à realização das medidas referidas no número anterior.

4 - As medidas previstas no n.º 2 podem ser aplicadas a outras explorações que, pela sua implantação, topografia ou contactos com a exploração, permitam suspeitar de uma eventual contaminação;

5 - As medidas referidas nos números 1 e 2 só serão levantadas quando a suspeita da presença da gripe aviária for infirmada pelo veterinário oficial.

Art. 5.º - 1 - Quando a presença da gripe aviária seja oficialmente confirmada numa exploração, a autoridade competente exigirá, em complemento das medidas enumeradas no n.º 2 do artigo anterior, a execução das seguintes medidas:

a) Abate imediato, no local, de todas as aves de capoeira presentes na exploração, devendo as aves de capoeira que tenham morrido ou sido abatidas, bem como os ovos, ser destruídos, sendo estas operações efectuadas de modo a reduzir ao mínimo o risco de propagação da doença;

b) A destruição ou tratamento de substâncias ou detritos, tais como alimentos para animais, camas e estrumes, susceptíveis de estarem contaminados, devendo o tratamento ser efectuado

em conformidade com as instruções do veterinário oficial por forma a assegurar a destruição de qualquer vírus da gripe aviária eventualmente presente;

c) A pesquisa e destruição da carne das aves de capoeira provenientes da exploração e abatidas durante o período provável de incubação da doença;

d) A pesquisa e destruição dos ovos para incubação produzidos durante o período provável de incubação da doença e que tenham saído da exploração, devendo as aves de capoeira provenientes desses ovos ser colocadas sob vigilância oficial e os ovos de mesa produzidos durante o período provável de incubação e retirados da exploração ser objecto, sempre que possível, de pesquisa e destruição, excepto se tiverem sido correctamente desinfectados;

e) Limpeza e desinfectação, nos termos do artigo 11.º, e das instalações de alojamento das aves de capoeira e dos locais adjacentes, dos veículos de transporte e de qualquer material susceptível de estar contaminado, após a realização das operações referidas nas alíneas a) e b);

f) A observância, após a realização das operações previstas na alínea anterior, de um vazio sanitário de, pelo menos, 21 dias antes da reintrodução de aves de capoeira na exploração;

g) A realização de um inquérito epidemiológico em conformidade com o artigo 7.º

2 - As medidas previstas no número anterior podem ser aplicadas a outras explorações caso a sua implantação, configuração do local ou contactos com a exploração permitam suspeitar de uma eventual contaminação.

Art. 6.º Nas explorações com dois ou mais bandos distintos, a autoridade competente pode, com base em critérios estabelecidos comunitariamente, prever derrogações ao disposto no n.º

1 do artigo anterior no que respeita aos bandos saudáveis de uma exploração infectada, desde que o veterinário oficial tenha confirmado que as operações aí ocorridas são de molde a manter os bandos completamente separados no que diz respeito ao alojamento, tratamento e alimentação, de tal modo que o vírus não possa propagar-se de um bando para outro.

Art. 7.º - 1 - O inquérito epidemiológico abrangerá:

a) A duração do período durante o qual a gripe aviária pode ter existido na exploração;

b) A origem possível da gripe aviária na exploração e a determinação das outras explorações em que se encontram aves de capoeira que possam ter sido infectadas ou contaminadas a partir dessa mesma origem;

c) A circulação de pessoas, aves de capoeira ou outros animais, veículos, ovos, carne e carcaças e de qualquer outro material ou substância susceptível de terem transportado o vírus da gripe aviária a partir de ou em direcção à exploração em causa.

2 - Será estabelecida uma célula de crise, a fim de garantir a coordenação das medidas necessárias para assegurar, no mais breve prazo, a erradicação da gripe aviária e para efeitos de realização do inquérito epizootiológico.

Art. 8.º - 1 - Quando o veterinário oficial suspeite que, numa exploração, existem aves da capoeira que podem ter sido contaminadas devido à circulação de pessoas, animais ou veículos ou por qualquer outro meio, essa exploração será colocada sob controlo oficial.

2 - O controlo oficial referido no número anterior tem como objectivo detectar qualquer suspeita de gripe aviária, proceder ao recenseamento e ao controlo dos movimentos de aves de capoeira, bem como, se for caso disso, executar a acção prevista no número seguinte.

3 - Quando uma exploração for submetida ao controlo oficial referido nos números anteriores, fica proibida a saída de aves de capoeira da exploração, excepto quando se trate de transporte directo para o matadouro, sob vigilância oficial, com vista ao seu abate imediato, devendo o veterinário oficial, antes da concessão da autorização, efectuar um exame clínico de todas as aves de capoeira a fim de informar a presença de gripe aviária na exploração.

4 - As restrições à circulação serão aplicáveis durante um período máximo de 21 dias a partir da última data de contaminação potencial, devendo essas restrições ser aplicadas durante um período de pelo menos sete dias.

5 - A autoridade competente, quando considerar que as condições o permitem, pode limitar as medidas previstas no presente artigo a uma parte da exploração e às aves de capoeira que aí se encontram, desde que essas aves tenham sido alojadas, tratadas e alimentadas de modo totalmente separado e por um pessoal distinto.

Art. 9.º - 1 - Logo que o diagnóstico da gripe aviária seja oficialmente confirmado, a autoridade competente delimitará, em redor da exploração infectada, uma zona considerada infectada que inclua uma zona de protecção com um raio mínimo de 3km, dentro de uma zona de vigilância com um raio mínimo de 10km, devendo a delimitação dessas zonas ter em conta os factores de ordem geográfica, administrativa, ecológica e epizootiológica relacionados com a gripe aviária e as estruturas de controlo.

2 - As medidas aplicadas na zona de protecção incluirão:

- a) A identificação de todas as explorações da zona onde existam aves de capoeira;
- b) Visitas periódicas a todas as explorações onde existam aves de capoeira e realização de exame clínico dessas aves, incluindo, se for caso disso, a colheita de amostras para exames laboratoriais, devendo ser mantido um registo das visitas e dos seus resultados;
- c) A manutenção de todas as aves de capoeira nos seus locais de alojamento ou em qualquer outro local que permita o seu isolamento;
- d) A utilização de meios de desinfectação adequados nas entradas e saídas das explorações;
- e) O controlo dos movimentos das pessoas que manipulam as aves de capoeira, os seus ovos e carcaças, bem como dos veículos que transportam as aves de capoeira, carcaças e ovos, sendo proibido o transporte de aves de capoeira, excepto em caso de trânsito nos grandes eixos rodoviários ou ferroviários;
- f) A proibição de saída das aves de capoeira da exploração bem como dos ovos para incubação, excepto se a autoridade competente autorizar o transporte:
- i) No caso das aves de capoeira, com vista ao seu abate imediato, para um matadouro situado, preferencialmente, na zona infectada, ou, em caso de impossibilidade, para um matadouro designado pela autoridade competente situado fora da zona infectada, devendo a carne dessas aves de capoeira ostentar a marca especial de salubridade prevista no n.º 1 do artigo 5.º da Directiva n.º 91/494/CEE;
- ii) No caso de pintos do dia ou das galinhas prontas para a postura, para uma exploração situada na zona de vigilância, onde não existam quaisquer outras aves de capoeira, devendo essa exploração ser colocada sob controlo oficial, de acordo com o previsto no n.º 2 do artigo 8.º;
- iii) No caso dos ovos para incubação, para um centro de incubação designado pela autoridade competente, devendo os ovos e as suas embalagens ser desinfectados antes da partida;
- g) A proibição de transportar ou de espalhar, sem autorização, os estrumes e chorumes de aves de capoeira;
- h) A proibição de feiras, mercados, exposições e outras situações que originem uma concentração de aves de capoeira ou de outras aves.

3 - Os transportes previstos nos pontos i), ii) e iii) da alínea f) devem ser efectuados directamente e sob controlo oficial, só podendo ser autorizados após uma inspecção sanitária da exploração pelo veterinário oficial e devendo os meios de transporte utilizados ser limpos e desinfectados antes e após a sua utilização.

4 - As medidas aplicadas na zona de protecção serão mantidas durante pelo menos 21 dias após a execução, nos termos do artigo 11.º, das operações preliminares de limpeza e de desinfectação na exploração infectada, passando então a zona de protecção a fazer parte da zona de vigilância.

5 - As medidas aplicadas na zona de vigilância incluirão:

- a) A identificação de todas as explorações da zona onde existam aves de capoeira;
- b) O controlo da circulação de aves de capoeira e de ovos para incubação dentro da zona;

c) A proibição da saída de aves de capoeira da zona durante os primeiros 15 dias, excepto para envio directo a um matadouro situado fora da zona de vigilância e designado pela autoridade competente, devendo a carne dessas aves ostentar a marca especial de salubridade prevista no artigo 5.º da Directiva n.º 91/494/CEE;

d) A proibição de saída dos ovos para incubação da zona de vigilância, excepto para incubadoras designadas pela autoridade competente, devendo os ovos e as suas embalagens ser desinfectados antes da partida;

e) A proibição de saída da zona de estrumes e chorumes de aves de capoeira;

f) A proibição de feiras, mercados, exposições e outras situações que originem a concentração de aves de capoeira ou de outras aves;

g) Sem prejuízo do disposto nas alíneas a) e b), a proibição do transporte de aves de capoeira na zona, com exclusão do trânsito pelos grandes eixos rodoviários ou ferroviários.

6 - As medidas aplicadas na zona de vigilância serão mantidas durante, pelo menos, 30 dias após a execução das operações preliminares de limpeza e desinfectação na exploração infectada, nos termos do artigo 11.º

7 - Caso as zonas referidas nos números anteriores se situem no território de vários Estados membros, as zonas de protecção e vigilância serão delimitadas conjuntamente pelas respectivas autoridades competentes.

Art. 10.º - 1 - A autoridade competente fixará as regras que lhe permitirão determinar a circulação dos ovos e das aves de capoeira.

2 - O proprietário ou o responsável pelas aves de capoeira deve apresentar à autoridade competente, sempre que esta o solicite, as informações relativas às aves de capoeira e aos ovos que entrem ou saiam da sua exploração.

3 - Qualquer pessoa que proceda ao transporte ou ao comércio de aves de capoeira e de ovos deve apresentar à autoridade competente as informações relativas aos movimentos das aves de capoeira e dos ovos que transportou ou comercializou e fornecer todos os pormenores relativos a essas informações.

Art. 11.º - 1 - Os desinfectantes a utilizar, bem como as suas concentrações, serão oficialmente aprovados pela autoridade competente.

2 - As operações de limpeza e desinfectação serão efectuadas nos termos do anexo II, de acordo com as instruções do veterinário oficial.

Art. 12.º As colheitas de amostras e os exames laboratoriais destinados a detectar a presença do vírus da gripe aviária devem ser efectuados em conformidade com o anexo III.

Art. 13.º - 1 - O laboratório comunitário de referência para a gripe aviária é o indicado no anexo IV, sendo as suas competências e obrigações, sem prejuízo do disposto na Decisão n.º 90/424/CEE, nomeadamente no seu artigo 28.º, as indicadas no referido anexo.

2 - Os laboratórios nacionais dos Estados membros, competentes em matéria de gripe aviária, são os enumerados no anexo V e assegurarão a ligação com o laboratório comunitário de referência previsto no número anterior.

Art. 14.º A vacinação contra a gripe aviária por meio de vacinas autorizadas pela autoridade competente só pode ser praticada em complemento das medidas de controlo tomadas aquando do aparecimento da doença e em conformidade com as disposições comunitárias sobre a matéria.

## ANEXO I

Autorização para saída de ovos de uma exploração sujeita às condições do n.º 2, alínea e), do artigo 4.º

1 - Para poderem sair da exploração suspeita, os ovos deverão:

a) Respeitar as exigências do capítulo IV do anexo da Directiva n.º 89/437/CEE;

b) Ser directamente enviados da exploração suspeita para o estabelecimento designado, devendo cada envio ser selado antes da partida pelo veterinário oficial da exploração suspeita e manter-se selado durante todo o transporte até ao estabelecimento designado.

2 - O veterinário oficial da exploração suspeita informará a autoridade competente do estabelecimento designado da intenção de lhe enviar os ovos.

3 - A autoridade competente responsável do estabelecimento designado assegurará que:

a) Os ovos referidos na alínea b) do n.º 1 sejam mantidos isolados dos outros ovos desde a sua chegada até serem tratados;

b) As cascas desses ovos sejam consideradas material de alto risco, em conformidade com a alínea b) do artigo 2.º da Portaria n.º 965/92, de 10 de Outubro, e sejam tratadas em conformidade com as exigências do capítulo II da mesma portaria;

c) O material de embalagem, os veículos utilizados para o transporte dos ovos referidos na alínea b) do n.º 1 e todos os locais com que os ovos possam ter estado em contacto sejam limpos e desinfectados por forma a destruir qualquer vírus de gripe aviária;

d) O veterinário oficial da exploração suspeita seja informado de qualquer expedição de ovos tratados.

## ANEXO II

(a que se refere a alínea b) do n.º 2 do artigo 11.º)

Processo de limpeza e de desinfectação de uma exploração infectada

### I - Limpeza preliminar e desinfectação

a) Logo que as carcaças das aves de capoeira tenham sido retiradas para serem destruídas, as partes dos locais onde as aves estiveram e qualquer parte das instalações de espaços fechados que tenham sido contaminadas durante o abate ou inspecção post mortem deverão ser limpas com desinfectante aprovado nos termos do artigo 11.º do presente diploma.

b) Qualquer tecido de aves de capoeira e quaisquer ovos que tenham podido contaminar as instalações, os espaços fechados, os utensílios, deverão ser cuidadosamente recolhidos e destruídos juntamente com as carcaças.

c) O desinfectante utilizado deve ficar na superfície tratada pelo menos durante vinte e quatro horas.

### II - Limpeza final e desinfectação

a) A gordura e as sujidades devem ser retiradas de todas as superfícies mediante aplicação de um desengordurante e em seguida lavadas com água.

b) Após a lavagem, deve voltar a aplicar-se desinfectante.

c) Sete dias depois, os locais devem ser tratados com um desengordurante, lavados com água fria, borrifados com desinfectante e lavados novamente com água.

d) As camas utilizadas e o estrume devem ser tratados através de um método capaz de matar o vírus, nomeadamente através dos seguintes meios:

i) Serem incinerados ou tratados pelo vapor de uma temperatura de 70°C;

ii) Serem enterrados a uma profundidade que impeça o acesso aos vermes e às aves selvagens;

iii) Serem empilhados e humedecidos (se necessário, para facilitar a fermentação) e cobertos para manter o calor, de modo que seja atingida uma temperatura de 20°C, e fiquem cobertos durante 42 dias de forma a impedirem o acesso de vermes e das aves selvagens.

## ANEXO III

(a que se refere o artigo 12.º)

Processo de diagnóstico para confirmação e diagnóstico diferencial da gripe aviária

Os processos de isolamento e caracterização dos vírus da gripe aviária devem ser considerados como directrizes e os mínimos a serem aplicados ao diagnóstico da doença.

Para efeitos do processo de diagnóstico e para confirmação do diagnóstico diferencial da gripe aviária, entende-se por:

«Gripe aviária»: uma infecção das aves de capoeira provocada por qualquer vírus A da gripe com um índice de patogenicidade intravenosa em frangos com seis semanas superior a 1,2 ou qualquer infecção com vírus A da gripe dos subtipos H5 ou H7 em relação aos quais a sequência de nucleótidos demonstrou a presença de múltiplos aminoácidos básicos no local de clivagem da hemaglutinina.

## CAPÍTULO I

### Amostragem e tratamento das amostras

#### 1 - Amostras

Zaragatoa de cloaca (ou fezes) e zaragatoa de traqueia de aves doentes; fezes ou conteúdo intestinal, tecido cerebral, traqueia, pulmões, fígado, baço e outros órgãos visivelmente afectados, provenientes de aves mortas recentemente.

#### 2 - Tratamento das amostras

Os órgãos e tecidos enumerados no n.º 1 podem ser tratados em conjunto, sendo, todavia, essencial o tratamento separado das substâncias fecais. As zaragatoas devem ser colocadas num meio antibiótico suficiente para assegurar a sua imersão completa. 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% m/v. As suspensões devem ser mantidas durante cerca de duas horas à temperatura ambiente (ou períodos mais longos a 40°C) e seguidamente clarificadas por centrifugação (por exemplo, 800 a 1000 rotações durante dez minutos).

#### 3 - Meio antibiótico

No que respeita às amostras de fezes, são necessárias concentrações elevadas de antibióticos, sendo a mistura típica de 10 000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina, 0,25 mg/ml de gentamicina e 5000 unidades/ml de micostatina numa solução salina tamponada com fosfato, podendo estes níveis ser reduzidos até cinco vezes no caso dos tecidos e das zaragatoas de traqueia. Para o controlo das Chlamydia podem ser adicionados 50 mg/ml de oxitetraciclina, sendo imperativo, aquando da preparação do meio, que o pH seja verificado após a adição dos antibióticos e reajustado ao pH 7,0-7,4.

## CAPÍTULO II

### Isolamento do vírus

#### Isolamento do vírus em ovos de galinha embrionados

O líquido sobrenadante clarificado deve ser inoculado em quantidades de 0,1ml-0,2ml na cavidade alantóide de cada um dos, pelo menos, quatro ovos de galinhas embrionados, incubados durante 8 a 10 dias, devendo, de preferência, estes ovos ser provenientes de um bando indemne de um organismo patogénico específico, podendo, em caso de impossibilidade, utilizar-se ovos provenientes de um bando sem anticorpos da gripe aviária. Os ovos inoculados devem ser mantidos a uma temperatura de 37°C e transiluminados diariamente. Os ovos com embriões mortos ou em vias de morrer, à medida que forem detectados, bem como os ovos restantes devem, seis dias após a inoculação, ser arrefecidos a uma temperatura de 4°C, sendo testados os líquidos alantóico-amnióticos em relação à actividade de hemaglutinação. Caso não seja detectada a hemaglutinação, o processo é repetido utilizando como inoculo os líquidos alantóico-amnióticos por diluir.

Quando for detectada a hemaglutinação, a presença de bactérias deve ser excluída por meio de cultura, devendo, caso seja detectada a presença de bactérias, os líquidos ser passados por um filtro de membrana de 450nm e, após a adição de mais antibióticos, ser inoculados em ovos embrionados, tal como acima descrito.

## CAPÍTULO III

### Diagnóstico diferencial

#### 1 - Diferenciação preliminar

Atendendo à importância de introduzir, o mais rapidamente possível, medidas de controlo destinadas a limitar a propagação do vírus, cada laboratório regional deve poder identificar, para além do vírus da doença de Newcastle, qualquer vírus hemaglutinante isolado como sendo um vírus da gripe dos subtipos H5 ou H7. Os líquidos hemaglutinantes devem, pois, ser utilizados num teste de inibição da hemaglutinação, tal como descrito nos capítulos V e VI. Uma inibição positiva, isto é, de 24 ou mais, com o anti-soro policional específico dos subtipos H5 ou H7 do vírus A da gripe e de título conhecido como sendo, pelo menos, de 29, poderia servir de identificação preliminar e permitir a imposição de medidas de controlo provisórias.

## 2 - Identificação confirmatória

Uma vez que existem 13 subtipos de hemaglutininas e 9 subtipos de neuraminidase de vírus da gripe e que podem registar-se em cada um deles variações, não é viável nem rentável que cada laboratório nacional mantenha anti-soros que permitam a plena caracterização antigénica dos isolados da gripe. No entanto, cada laboratório nacional deve:

- i) Confirmar que o isolado é um vírus A da gripe, utilizando o teste da dupla difusão imunológica para detectar o grupo de antígeno, segundo o processo descrito no capítulo IX (se o laboratório nacional assim o preferir, podem ser utilizadas as técnicas de imunofluorescência e Elisa para detectar o grupo de antígenos);
- ii) Determinar se o isolado é ou não do subtipo H5 ou H7;
- iii) Realizar o teste do índice da patogenicidade intravenosa em frangos com seis semanas, como descrito no capítulo VII do presente anexo. Os índices de patogenecidades intravenosas superiores a 1,2 indicam a presença do vírus, exigindo a aplicação completa das medidas de controlo (seria útil que os laboratórios nacionais efectuassem igualmente testes para determinar a capacidade do isolado produzir placas em culturas de células como especificado no capítulo VIII);
- iv) Enviar imediatamente todos os isolados de gripe aviária e dos subtipos H5 ou H7 ao laboratório de referência comunitário, com vista à sua caracterização completa.

## 3 - Outras classificações e caracterização de isolados

O laboratório de referência comunitário deve receber dos laboratórios nacionais todos os vírus hemaglutinantes, com vista à realização de outros estudos antigénicos que permitam uma melhor compreensão da epizootiologia da(s) doença(s) na Comunidade Europeia, respeitando assim as competências e as tarefas do laboratório comunitário de referência.

Para além destes deveres, o laboratório comunitário de referência deve proceder à definição completa dos tipos antigénicos de todos os vírus de gripe recebidos. Em relação aos vírus H5 e H7, que não apresentam índices de patogenicidade intravenosa superiores a 1,2, deve-se igualmente determinar a sequência de nucleótidos do gene de hemaglutinina, a fim de estabelecer se existem ou não múltiplos aminoácidos básicos no ponto de clivagem da proteína de hemaglutinina. Os vírus que têm múltiplos aminoácidos básicos no ponto de clivagem apesar de apresentarem índices baixos de patogenicidade exigem a aplicação completa das medidas de controlo da gripe aviária.

## CAPÍTULO IV

Testes sorológicos para os anticorpos do vírus da gripe aviária

1 - Durante os programas de erradicação, quando já seja conhecido o subtipo H do vírus responsável, ou utilizando o vírus homólogo como antígeno, pode proceder-se à vigilância serológica relativamente a indícios de infecção, através de testes de inibição da hemaglutinação, de acordo com o processo descrito nos capítulos V e VI.

Se for desconhecido o subtipo de hemaglutinina, podem ser obtidos sinais de infecção como os vírus A da gripe através da detecção de anticorpos em relação ao grupo de antígenos específicos.



Para tal, podem ser utilizados tanto um teste de dupla difusão imunológica (descrito no capítulo IX), como um teste Elisa (neste caso, há o problema da especificidade do hospedeiro do teste, uma vez que a mesma é dependente da detecção das imunoglobulinas do hospedeiro). As aves aquáticas raramente dão resultados positivos nos testes de dupla difusão imunológica e, a não ser que o subtipo seja conhecido, só é viável examinar essas aves relativamente à presença de anticorpos para os subtipos H5 e H7.

2 - a) Amostras. - Devem ser colhidas amostras de sangue de todas as aves se a dimensão do bando for inferior a 20, ou de 20 aves no caso de bandos maiores (tal dá origem a uma probabilidade superior a 99% de detecção de, pelo menos, um soro positivo de 25% ou mais se o bando for positivo, independentemente da dimensão do bando). Deve deixar-se o sangue coagular, utilizando-se o soro na realização do teste.

b) Exame dos anticorpos. - As amostras individuais de soro devem ser testadas em relação à sua capacidade de inibirem o antígeno hemaglutinante do vírus da gripe aviária em testes padrão de inibição da hemaglutinação, como definido no capítulo VI.

Existe alguma polémica sobre se devem ser utilizadas quatro ou oito unidades de hemaglutinina nos testes de inibição da hemaglutinação. Aparentemente, ambas as doses são válidas e caberia aos laboratórios nacionais a escolha dessa dose.

Todavia, o antígeno utilizado afecta o nível em que um soro é considerado positivo: para quatro unidades de hemaglutinina, um soro positivo apresenta um título maior ou igual a 2 (elevado a 4); para oito unidades de hemaglutinina, um soro positivo apresenta um título maior ou igual a 2.

## CAPÍTULO V

### Teste de hemaglutinação (HA)

#### Reagentes

1 - Solução isotónica salina tamponada com fosfato (0,05M) a pH 7,0-7,4.

2 - Colher hemácias de, pelo menos, três frangos sem organismos patogénicos específicos (se tal não for possível, pode colher-se sangue de aves controladas regularmente e que se tenham apresentado isentas de anticorpos do vírus da gripe aviária) e misturá-las num volume igual de solução de Alsever. As células devem ser lavadas três vezes na solução isotónica salina tamponada com fosfato antes da sua utilização, recomendando-se, para o teste, uma suspensão a 1% (células empacotadas v/v).

3 - O laboratório de referência comunitário fornecerá ou recomendará os vírus H5 ou H7, de reduzida virulência, para utilização como antígenos padrão.

#### Técnica

1 - Colocar 0,025ml de solução isotónica salina tamponada com fosfato em cada cavidade de uma placa de microtitulação de plástico (devem ser utilizadas cavidades com fundos em V).

2 - Colocar 0,025ml de suspensão de vírus (isto é, líquido alantóico) na primeira cavidade.

3 - Utilizar um diluente de microtitulação para proceder às diluições duplas (1 : 2 a 1 : 4096) do vírus de cavidade ao longo da placa.

4 - Colocar mais 0,025ml de solução isotónica salina tamponada com fosfato em cada cavidade.

5 - Juntar 0,025ml de hemácias a 1% em cada cavidade.

6 - Misturar, agitando ligeiramente, e colocar a 4°C.

7 - Ler as placas trinta a quarenta minutos depois, quando as testemunhas tiverem sedimentado. A leitura é feita através da inclinação da placa, observando a presença ou a ausência de um fluxo, em forma de lágrima, das hemácias devendo as cavidades sem hemaglutinação fluir à mesma velocidade que as células testemunha sem vírus.

8 - O título de hemaglutinação é a diluição mais elevada que provoca a aglutinação de hemácias. Essa diluição pode ser considerada como contendo uma unidade de hemaglutinação. Um método mais exacto de determinação do título de hemaglutinação

consiste na realização do teste de hemaglutinação em vírus provenientes de uma série de diluições iniciais mais próximas, isto é, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, etc. Este método é recomendado para a preparação exacta do antígeno destinado aos testes de inibição da hemaglutinação (capítulo VI).

## CAPÍTULO VI

### Teste de inibição da hemaglutinação

#### Reagentes

- 1 - Solução isotónica salina tamponada com fosfato.
- 2 - Líquido alantóico que contenha vírus, diluído na solução isotónica salina tamponada com fosfato para conter quatro ou oito unidades de hemaglutinação por 0,025ml.
- 3 - Hemácias de frango a 1%.
- 4 - Soro-testemunha de frango, negativo.
- 5 - Soro-testemunha positivo.

#### Técnica

- 1 - Colocar 0,025ml de solução isotónica salina tamponada com fosfato em todas as cavidades de uma placa de microtitulação de plástico (com cavidades com fundos em V).
- 2 - Colocar 0,025ml de soro na primeira cavidade da placa.
- 3 - Utilizar um diluente de microtitulação para fazer diluições duplas de soro, de cavidade em cavidade, ao longo da placa.
- 4 - Juntar 0,025ml de líquido alantóico diluído que contenha quatro ou oito unidades de hemaglutinação.
- 5 - Misturar, agitando ligeiramente, e colocar a placa a 4°C durante pelo menos sessenta minutos ou à temperatura ambiente durante pelo menos trinta minutos.
- 6 - Juntar 0,025ml de hemácias a 1% a todas as cavidades.
- 7 - Misturar, agitando ligeiramente, e colocar a 4°C.
- 8 - Ler as placas trinta a quarenta minutos depois, quando a testemunha de hemácias tiver sedimentado. A leitura é feita através da inclinação da placa, observando a presença ou a ausência de um fluxo, em forma de lágrima, das hemácias. As cavidades sem hemaglutinação devem fluir à mesma velocidade que as células testemunha que contêm apenas hemácias (0,025ml) e solução isotónica salina tamponada com fosfato (0,05ml).
- 9 - O título da inibição da hemaglutinação é a diluição mais elevada de anti-soro que provoca a inibição completa de quatro ou oito unidades de vírus (deveria ser incluída em cada teste uma titulação da hemaglutinação para confirmar a presença da unidade de hemaglutinação exigida).
- 10 - A validade dos resultados depende da obtenção de um título inferior a 2 (elevado a 4) para quatro unidades de hemaglutinação ou 2 (elevado a 2) para oito unidades de hemaglutinação com o soro-testemunha negativo e de um título de diluição imediatamente superior ou imediatamente inferior ao título conhecido do soro-testemunha positivo.

## CAPÍTULO VII

### Índice de patogenicidade intravenosa

- 1 - Diluir, a 10<sup>-1</sup> (elevado a -1) numa solução isotónica salina estéril, líquido alantóico infeccioso colhido recentemente, de preferência do isolamento inicial, sem qualquer selecção.
- 2 - Injectar intravenosamente 0,1 ml de vírus diluído em cada um dos frangos com 10 semanas (devem ser usadas aves indemnes do patogénico específico).
- 3 - As aves são examinadas com intervalos de vinte e quatro horas, durante 10 dias.
- 4 - Em cada observação, cada ave é considerada normal (0), doente (1), muito doente (2) ou morta (3).

5 - Neste exemplo são indicados resultados registados e o índice calculado:  
(ver documento original)

Índice = resultado médio por ave e por observação (Ver formula no documento original)

## CAPÍTULO VIII

Avaliação da capacidade de formação de placas

1 - É geralmente mais aconselhável utilizar uma série de diluições do vírus, a fim de assegurar a presença na placa de Petri de um número óptimo de placas, devendo ser suficientes diluições de 10 vezes até 10 (elevado a -7) numa solução isotónica salina tamponada com fosfato.

2 - Em placas de Petri de 5cm de diâmetro, preparam-se camadas simples confluentes de células de embriões de pintos ou linhas adequadas de células (por exemplo, rim de bovino Madin-Darby).

3 - Junta-se a cada uma de duas placas de Petri 0,2ml de cada diluição de vírus e deixa-se absorver durante trinta minutos.

4 - Depois de lavar três vezes com solução isotónica salina tamponada com fosfato, as células infectadas são cobertas com o respectivo meio que contém 1% m/v de ágar e 0,01 mg/ml de tripsina, sendo importante que não seja adicionado soro ao meio de cobertura.

5 - Após setenta e duas horas de incubação a 37°C, as placas devem ter a dimensão suficiente, sendo estas placas observadas mais correctamente se a camada de ágar for removida e se a camada simples de células for corada com cristal violeta (0,5% m/v) em etanol (25% v/v).

6 - Todos os vírus devem originar placas claras quando incubados na presença da tripsina na cobertura. Quando esta não é utilizada na cobertura, apenas os vírus virulentos para os frangos produzem placas.

## CAPÍTULO IX

Difusão dupla imunológica

O melhor método para demonstrar a presença do vírus A da gripe consiste na demonstração da existência do nucleocapsídeo ou matriz de antígenos, comum a todos os vírus A da gripe. Para tal, efectuam-se geralmente testes de dupla difusão imunológica, recorrendo tanto a preparados concentrados de vírus como a extractos de membranas corioalantóicas infectadas. Podem obter-se preparados adequados de vírus concentrados através da centrifugação a alta velocidade de fluido alantóico infeccioso e rompimento do vírus para libertar o tratamento com o detergente laurilsarcosinato de sódio. Pode também ser utilizada a precipitação ácida através de adição de ácido clorídrico 1N ao fluido alantóico infeccioso para obter um pH final de 3,5-4,0, refrigeração durante pelo menos uma hora a 0°C e centrifugação a baixa velocidade a 1000g durante dez minutos.

O sobrenadante pode ser eliminado e o precipitado que contém o vírus de novo suspenso num volume mínimo de tampão de sarcosil-glicina (1% de laurilsarcosinato de sódio tamponado a pH 9,0 com glicina a 0,5M). Estes preparados têm tanto o nucleocapsídeo como a matriz de antígenos.

Beard (1970) descreveu a preparação de um nucleocapsídeo rico em antígenos a partir de membranas corioalantóicas retiradas de ovos infectados. Este método engloba: remoção das membranas corioalantóicas de ovos infectados positivos para a hemaglutinina, trituração ou homogeneização das membranas, congelamento ou descongelamento três vezes, seguindo-se uma centrifugação a 1000g durante dez minutos. O revestimento exterior é rompido e o sobrenadante tratado com formalina a 0,1% para a utilização como antígeno.

Nos testes da dupla difusão imunológica pode ser empregue qualquer um dos dois antígenos, utilizando-se geles de agarose a 1%, ou ágar, que contenham cloreto de sódio a 8,0% perfazendo-se com tampão de fosfato 0,1 M, com pH de 7,2. O vírus A da gripe é confirmado através das linhas de precipitina formadas pelo antígeno de teste e pelo antígeno positivo conhecido de um anti-soro positivo conhecido, que se misturam dando origem a uma linha de identidade.

## ANEXO IV

Nome do laboratório comunitário de referência para a gripe aviária

Nome do laboratório: Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, UK - Surrey KT15 3NB.

São as seguintes as competências e tarefas do laboratório comunitário de referência da gripe aviária:

1) Coordenar, em consulta com a Comissão, os métodos de diagnóstico da gripe aviária nos Estados membros, nomeadamente, mediante:

a) A caracterização, posse e funcionamento das estirpes do vírus da gripe aviária destinados aos testes serológicos e à prestação do anti-soro;

b) O fornecimento dos soros de referência e de outros reagentes de referência aos laboratórios de referência para a normalização dos testes e dos reagentes utilizados em cada Estado membro;

c) A constituição e a conservação de uma colecção de estirpes e isolados do vírus da gripe aviária;

d) A organização periódica de testes comunitários comparativos dos processos de diagnóstico;

e) A recolha e o confronto dos dados e informações relativos aos métodos de diagnóstico utilizados e os resultados dos testes efectuados na Comunidade;

f) A caracterização dos isolados do vírus da gripe aviária pelos métodos mais avançados, de modo a permitir uma melhor compreensão da epizootiologia da gripe aviária;

g) O acompanhamento da evolução da situação em todo o mundo em matéria de vigilância, epizootiologia e de prevenção da gripe aviária;

h) Actualização permanente dos conhecimentos sobre o vírus da gripe aviária e sobre outros vírus implicados, para permitir um diagnóstico diferencial rápido;

i) A aquisição de um conhecimento aprofundado na preparação e utilização dos produtos de medicina veterinária imunológica utilizados na erradicação e no controlo da gripe aviária;

2) Prestar ajuda activa na identificação de focos de gripe aviária nos Estados membros através do estudo dos isolados de vírus que lhe sejam enviados para confirmação do diagnóstico, caracterização e estudos epizootiológicos. O laboratório deveria, em especial, poder analisar a sequência dos nucleóticos, de modo a permitir a determinação da sequência de ácidos aminados deduzidos no ponto de clivagem da molécula da hemaglutinina dos vírus gripais dos subtipos H5 ou H7;

3) Facilitar a formação ou reciclagem dos peritos em diagnóstico de laboratório para harmonização das técnicas de diagnóstico em toda a Comunidade.

#### ANEXO V

Lista dos laboratórios nacionais para a gripe aviária

Bélgica:

Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles.

Dinamarca:

National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division, Harevej 2, DK-8200 Aarhus N.

Alemanha:

Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, Postfach 280, D-3100 Celle.

França:

Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires - Laboratoire Central de Recherches Agricoles et Porcines, BP 53, F-22440 Ploufragan.

Grécia:

Ινστιτούτο Αοιμολογικών και Παράσιτικών Νοσημάτων 66, 26ης Οκτωβρίου, 54627-Βεγγαλονίκη (Instituto das Doenças Infecciosas e Parasitárias 66, rue du 26 octobre, GR-54627 Thessaloniki).

Irlanda:

Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Castleknock, IRL-Dublin 15.

Itália:

Istituto Patologie Aviaire, Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Napoli, via Aniezzo, Falcone, 394, I-80127 Napoli F Delpino I.

Luxemburgo:

Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles.

Países Baixos:

Centraal Diergeneeskundig Instituut, Vestiging Virologie, Houtribweg 39, NL-8221 RA Lelystad.

Portugal:

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), Estrada de Benfica 701, P-1500 Lisboa.

Espanha:

Centro Nacional de Referencia para la Peste Aviar es el Laboratorio Nacional de Sanidad y Producción Animal de Barcelona, Zona Franca Circunvalación - Tramo 6, Esquina Calle 3, E-Barcelona.

Reino Unido:

Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, UK-Surrey KT15 3NB.

#### ANEXO VI

Critérios mínimos aplicáveis aos planos de intervenção

Os planos de intervenção devem prever pelo menos:

- 1) A criação a nível nacional de um centro de crise que coordenará todas as medidas de urgência no Estado membro em causa;
- 2) Uma lista dos centros locais de emergência que dispõem de equipamento adequado para coordenar as medidas de controlo a nível local;
- 3) Informações pormenorizadas sobre o pessoal encarregado das medidas de emergência e as respectivas qualificações profissionais e responsabilidades;
- 4) Possibilidade de os centros locais de emergência contactarem rapidamente as pessoas ou organizações directa ou indirectamente envolvidas em caso de ocorrência de um foco de infecção;
- 5) Material e equipamento adequado disponível para levar a efeito as medidas de emergência;
- 6) Instruções precisas relativamente às acções a desenvolver em caso de suspeita e confirmação da infecção ou contaminação, incluindo meios de destruição das carcaças;
- 7) Programas de formação com vista à actualização e desenvolvimento dos conhecimentos em matéria de actuação in loco e de processos administrativos;
- 8) Para os laboratórios de diagnóstico, instalações adequadas para exames post mortem, capacidade necessária para análise de serologia, histologia, etc., e técnicas actualizadas de diagnóstico rápido (devem ser previstas as condições necessárias para o rápido transporte das amostras);
- 9) Precisoões sobre a quantidade de vacina contra a gripe aviária estimada necessária em caso de recurso à vacinação de emergência;
- 10) Disposições regulamentares necessárias à execução dos planos de intervenção.