

Buenos Aires, 31 de Octubre de 1996

Visto el Expediente N° 41695/96 del Registro del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, en el cual, la GERENCIA DE LUCHAS SANITARIAS, propone dictar normas de procedimientos para el control y la vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Newcastle y,

CONSIDERANDO:

Que es necesario, que la República Argentina adopte oficialmente una definición de la enfermedad de Newcastle, a fin de armonizar conceptos sobre la misma acordes con los enunciados por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

Que por Decreto N° 254/67, la enfermedad de Newcastle ha sido incorporada al Artículo 6° del Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales y por tanto su denuncia es obligatoria.

Que es necesario establecer medidas de control a nivel Nacional que deberán ser adoptadas en casos en que se presenten brotes de la enfermedad, a fin de asegurar el desarrollo de la producción avícola y contribuir a la protección de la salud animal en el país.

Que los brotes de la enfermedad de Newcastle pueden adquirir rápidamente un carácter epizootico y provocar altos niveles de mortandad y por tanto comprometer seriamente la productividad y rentabilidad de las explotaciones avícolas.

Que en los casos en que se detecten brotes de la enfermedad es factible tomar medidas estrictas que resulten eficaces para evitar su propagación.

Que el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle debe efectuarse mediante técnicas establecidas internacionalmente, acordadas y reconocidas a nivel oficial, a

fin de compatibilizar sus resultados en todo el territorio Nacional.

Que es responsabilidad de este SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, 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 Comisión Nacional de Sanidad Avícola ha tomado la intervención que le compete no encontrando restricciones a la aplicación de la norma que se propicia.

Que la SUBGERENCIA DE ASUNTOS JURIDICOS, ha dictaminado al respecto no encontrando reparos de orden legal alguno.

Que el suscripto es competente, para resolver en esta instancia, en virtud de las facultades conferidas por el Artículo 33° del Anexo I del Decreto N° 1.553 del 12 de agosto de 1991, reglamentario de la Ley N° 23.899.

Por ello,

EL ADMINISTRADOR GENERAL DEL  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL

RESUELVE

ARTICULO 1º: La REPUBLICA ARGENTINA adopta la siguiente definición de la enfermedad de Newcastle (ENC): " Enfermedad de las aves de corral, producida por cualquier cepa aviaria del Paramixovirus 1, con un Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC) superior a 0.7 en pollos de un día de edad."

ARTICULO 2º: Los profesionales veterinarios, o personas responsables o

encargadas de cualquier explotación avícola, industrial o doméstica, que detecte en las aves a su cargo signos de enfermedad de Newcastle o resultados de laboratorio compatibles con la misma, deberá obligatoriamente y en forma inmediata realizar la denuncia al SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

ARTICULO 3º: Las denuncias que se mencionan en el Artículo precedente, serán recepcionadas en las oficinas locales de la GERENCIA DE LUCHAS SANITARIAS más próxima al establecimiento o en forma telefónica, u otra a la sede Central del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

ARTICULO 4º: Ante la denuncia de un foco de la enfermedad de Newcastle o sospecha de la misma en uno o más establecimientos avícolas, el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, pondrá la explotación bajo vigilancia oficial, a fin de garantizar que se adopten las acciones preventivas y profilácticas que permitan revertir la situación sanitaria.

ARTICULO 5º: El SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL en virtud de lo establecido en el Artículo precedente, tomará o hará que se tomen las siguientes medidas:

- a) Censo de todas las aves del establecimiento detallando número de aves muertas, número de aves con síntomas clínicos y evolución de estos datos en el período de vigilancia.
- b) Toma de muestras y envío al laboratorio, en la forma y con las indicaciones que se detallan en el Anexo I de la presente Resolución.
- c) Aislamiento de todas las aves garantizando que no tomen contacto con otras aves.
- d) Prohibición de ingreso de nuevas aves y salida de las que se encuentren en el establecimiento.
- e) Todos los movimientos de personas, animales, vehículos, cadáveres de aves, residuos, guano. implementos alimentos o cualquier otro elemento capaz de

transmitir la enfermedad, estará subordinado a la autorización del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL o a la de las personas que este Servicio designe. Solamente se autorizará la salida de huevos para consumo, si los mismos se destinan directamente a un establecimiento procesador de ovoproductos (huevo líquido o deshidratado).

f) Que se realice la investigación epidemiológica correspondiente de acuerdo a lo establecido en el Artículo 8° de la presente resolución.

g) Desinfección de las entradas y salidas del establecimiento y de las instalaciones que se encuentran en el mismo.

ARTICULO 6°: Las medidas previstas en el Artículo precedente podrán hacerse extensivas a otras explotaciones vecinas si por su ubicación geográfica o contacto y movimiento de personas se sospeche de posible contaminación.

ARTICULO 7°: Si se confirma por las pruebas de laboratorio, el diagnóstico de enfermedad de Newcastle , el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL garantizará que se adopten las siguientes medidas:

A) Delimitación de una "zona de foco" o "zona de protección" de un radio mínimo de cinco (5) Km rodeada de una "zona perifocal" o "zona de vigilancia" de un mínimo de diez (10) Km de radio.

B) Sacrificio in situ de todas las aves afectadas del establecimiento y destrucción de los cadáveres y huevos. Estas operaciones se realizarán limitando al máximo el riesgo de propagación de la enfermedad, de conformidad a lo establecido en el Anexo II de la presente Resolución.

C) Limpieza y desinfección de instalaciones y sus alrededores, implementos, vehículos de transporte y de todo material que pueda estar contaminado de acuerdo a lo que se establece en el Anexo III de la presente Resolución.

D) Después de efectivizadas las operaciones indicadas en A, B, y C, la interposición

de un período de descanso o espera de veintiun (21) días como mínimo antes de volver a introducir aves en el establecimiento.

E) En la "zona de foco" o de protección se aplicarán las siguientes medidas:

- e.1. Localización de todas las explotaciones avícolas de la zona.
- e.2. Visitas y exámen clínico y o de laboratorio si fuera necesario a todos los establecimientos, registrando resultados de las mismas.
- e.3. Desinfección apropiada de todos los lugares de salida y entrada de esos establecimientos.
- e.4. Control del tránsito dentro de la zona de aves, personas que trabajen con las mismas, vehículos de transporte, cadáveres, huevos.
- e.5. Los movimientos de aves para su sacrificio al matadero, de pollitos de un día, de huevos para incubar o para consumo, podrán realizarse únicamente con autorización del Veterinario Oficial o de la persona que el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL designe.
- e.6. En caso de transporte para sacrificio, el Veterinario Oficial responsable del establecimiento de faena 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.
- e.7. Los pollitos de un (1)día o huevos para incubación podrán ser transportados de preferencia a un establecimiento o planta de incubación dentro de la zona de foco o perifocal, o de lo contrario a un establecimiento con control Oficial.
- e.8. Los huevos para consumo podrán ser transportados preferiblemente a un establecimiento elaborador de ovoproductos, o bien deberán ser identificados para su comercialización dentro de la zona de foco o perifocal, o en otra zona previa desinfección de los mismos.

e.9. No habiéndose registrado otras novedades , las medidas de la zona focal o de protección se mantendrán durante veintiun (21) días como mínimo a partir del día en que se realizaron las tareas de desinfección en el establecimiento.

F) En la "zona perifocal" o de vigilancia se dispondrán las siguientes medidas:

- f.1. Localización de las explotaciones avícolas de la zona
- f.2. Control de los desplazamiento de aves y huevos para incubar dentro de la zona.
- f.3. Las aves destinadas a faena o los huevos para incubar si son transportados fuera de la zona perifocal, deberán declarar al establecimiento que se destinan el cual recibirá Control Veterinario Oficial.
- f.4. De no haberse registrado novedades en la zona, las medidas que anteceden se mantendrán durante 30 días después de haberse realizado las tareas de desinfección en los establecimientos infectados.

G) Tanto en la zona focal como en la perifocal, estará prohibido la realización de ferias o exposiciones, el transporte de guano, desperdicios e implementos usados de galpones fuera de las zonas circunscriptas.

ARTICULO 8º: La investigación epidemiológica estudiará los siguientes aspectos: - Estimación del período de tiempo de la presencia de la enfermedad de Newcastle en la explotación.-Posibles orígenes de la enfermedad en otras aves de corral o silvestres o en cautividad, así como aquellos que hayan podido contaminarse a partir del foco. -Movimientos de personas, vehículos, carne, cadáveres, guano, etc que hubieran podido introducir la enfermedad en el establecimiento.

ARTICULO 9º: El SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL podrá disponer la puesta en marcha de un plan de vacunación de las aves de corral, cuestionadas y de urgencia, en explotaciones

no sometidas a las restricciones establecidas en el Artículo 4° de la presente Resolución.

ARTICULO 10°: El SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, podrá disponer desde el principio la formación de una Comisión Técnica, constituida por profesionales veterinarios de organismos oficiales o privados destinada a coordinar las medidas de vigilancia y control del brote que se establecen en la presente Resolución.

ARTICULO 11°: Los infractores a la presente Resolución, serán pasibles de ser sancionados de acuerdo a lo establecido en la Ley 23899 y 24305.

ARTICULO 12°: Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial, y archívese.

RESOLUCION N°: 683/96

**PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCION DE UNA EXPLOTACION AVICOLA INFECTADA**

**1era Limpieza y desinfección:**

a) 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 SENASA. El desinfectante deberá permanecer durante 24 hs como mínimo.

**2da Limpieza y desinfección:**

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

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

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

d) 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 70°C. Se ubicarán en un lugar apartado y cubierto al amparo de otros animales o aves durante por lo menos 42 días.

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

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.



**APLICACION DEL RIFLE SANITARIO O MATANZA EN UNA EXPLOTACION AVICOLA INFECTADA.**

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

B. Se deberá evitar que se escapen animales.

C. 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.

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

E. 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 su limpieza y desinfección.

**ELIMINACION DE LOS CADAVERES Y O MATERIALES Y RESIDUOS**

Para la eliminación de las carcazas, vísceras, estiércol, y alimentos, se podrá realizar el a) entierro o b) incineración.

a) 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.

b) 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.

## **INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

### **TOMA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO DE LAS MISMAS**

#### **1. Muestras**

Hisopados de cloaca o materias fecales e hisopados traqueales de aves enfermas; materias fecales o contenido intestinal, tejido cerebral, tráquea, pulmones, hígado, bazo y otros órganos manifiestamente afectados procedentes de aves recién muertas

#### **2. Tratamiento de las muestras**

Aunque los órganos y los tejidos mencionados en el punto 1 pueden mezclarse, las materias fecales deberán tratarse por separado. Se sumergirán completamente los hisopados en una cantidad suficiente de medio con antibióticos. A su vez las muestras de materias fecales y de órganos deberán homogeneizarse (en un mezclador cerrado o utilizando un mortero y arena esterilizada) en un medio con antibióticos para convertirlas en suspensiones en ese medio al 10-20% p/v. Posteriormente, esas suspensiones se dejarán a temperatura ambiente durante 2 horas aproximadamente (o durante más tiempo a una temperatura de 4°C) y se clarificarán por centrifugación (por ejemplo, de 800 a 1000g durante 10 minutos).

#### **3. Medio con antibióticos**

Para las muestras de materias fecales es necesaria una fuerte concentración de

antibióticos; así, una mezcla típica es la siguiente: 10.000 U/ml de Penicilina, 10mg./ml de Estreptomicina, 0.25mg/ ml de Gentamicina y 5000U/ml de Micostatina en una solución salina amortiguadora de fosfato. Estos niveles pueden reducirse hasta 5 veces cuando se trabaje con tejidos e hisopados traqueales. Para evitar el crecimiento de Chlamydia, pueden añadirse 50 mg/ml de Oxitetraciclina. Al elaborar el medio es imprescindible comprobar el pH después de añadir los antibióticos y corregirlo hasta que fluctúe entre 7,0 y 7,4.

## **AISLAMIENTO DEL VIRUS**

Aislamiento del virus en huevos embrionados de gallina

Deberá inocularse dosis de 0,1 a 0,2 ml del líquido sobrenadante clarificado dentro de la cavidad alantoidea de al menos 4 huevos embrionados de gallina que hallan sido incubados de 8 a 10 días. Es preferible que los huevos procedan de una parvada exenta de patógenos específicos (SPF), aunque si ello no fuera posible, podrán utilizarse huevos de una parvada exenta de anticuerpos del virus de la Enfermedad de Newcastle. Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37° C y se examinarán a trasluz diariamente. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos serán refrigerados a 4°C a medida que se valgan comprobando. Los demás lo serán a la misma temperatura 6 días después de la inoculación. Las muertes embrionarias ocurridas dentro de las primeras 24 hs después de la inoculación, deberán descartarse. Los fluidos alantoideos o amnióticos se someterán además a la prueba de Hemoaglutinación. Si la prueba de Hemaglutinación resultase negativa, deberá repetirse el procedimiento anterior utilizando fluido alantoideo o amniótico no diluido como inóculo.

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

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

### 1. Diferenciación Preliminar

Como es fundamental que se adopten, lo antes posible, medidas provisionales para limitar la extensión de la enfermedad de Newcastle, los fluidos hemoaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de la Hemoaglutinación, descritas en el punto 2 . Una inhibición positiva, es decir de  $2^4$  o más, con antisuero policlonal específico para el virus de la enfermedad de Newcastle (con un título conocido de al menos  $2^9$ ), se considerará una identificación preliminar suficiente para imponer medidas provisionales para la lucha contra la enfermedad.

### 2. Confirmación

La presencia del virus de la enfermedad de Newcastle volverá a confirmarse por inhibición de la hemoaglutinación con antisueros de gallina monoespecíficos. Todo el material positivo deberá someterse a la prueba del Índice de Patogenicidad Intracerebral . Los índices de patogenicidad superiores a 0,7 indicarán que la presencia del virus exige de la aplicación de todas las medidas de lucha contra la enfermedad.

Dado que a menudo pueden aislarse vivas las cepas utilizadas en vacunas, y a fin de que las mismas puedan identificarse con rapidez, el laboratorio del SENASA procurará

obtener esos anticuerpos monoclonales y facilitárselos a los laboratorios de la red para que puedan confirmar el aislamiento de los virus vacunales por pruebas sencillas de HI.

## **PRUEBAS RÁPIDAS PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

### **1. Detección de anticuerpos en aves no vacunadas**

La mayoría de los laboratorios que efectúan diagnósticos de la enfermedad de Newcastle conocen la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación. Las recomendaciones que siguen se refieren a esta prueba para la medición de anticuerpos del virus. No obstante la prueba de inmunoadsorción con enzimas (ELISA) da buenos resultados cuando se la utiliza para detectar los anticuerpos del virus.

### **2. Muestras**

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

### **3. Exámen de los anticuerpos**

Se probará la capacidad de las muestras individuales de suero para inhibir el antígeno hemoaglutinante del virus de la enfermedad de Newcastle en pruebas estandar de HI de acuerdo con lo descrito en el punto .

Como las opiniones difieren en cuanto a la utilización de 4 u 8 unidades de hemoaglutinación en la prueba de HI, y al parecer ambas dosis son válidas, se deja al arbitrio de los laboratorios. Tengasé en cuenta, sin embargo, que del antígeno utilizado dependerá el nivel en el que un suero sea considerado positivo: con 4 unidades de hemoaglutinina, un suero se considerará positivo cuando presente un título superior o igual a  $2^4$ ; mientras que con 8 unidades el título deberá ser igual o mayor a  $2^3$ .

### **PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN (HA)**

#### Reactivos

- a) Solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0,05 M) de pH 7,0 a 7,4.
- b) Hematíes extraídos de un mínimo de 3 gallinas exentas de patógenos específicos (a falta de éstas, podrá utilizarse sangre de aves que hallan estado bajo control regular y que estén exentas de anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle), reunidos y mezclados a partes iguales con solución de Alsever. Antes de utilizarlos, los hematíes deberán lavarse 3 veces en la solución salina isotónica amortiguadora de fosfato. Para la prueba se recomienda una suspensión en dicha solución al 1%.
- c) se recomienda la utilización como antígeno estandar de la cepa de virus de la enfermedad de Newcastle cepa La Sota.

#### Procedimiento

- a) Distribuir 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0,05 M) de pH 7,0 a 7,4.

- b) Introducir 0,025 ml de suspensión de virus( es decir fluido alantoideo) en el primer pocillo.
- c) Utilizar una micropipeta para hacer microdiluciones del virus a la mitad (de 1:2 a 1:4 096) en toda la placa.
- d) Distribuir otros 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada pocillo.
- e) Añadir 0,025 ml de una suspensión al 1% de hematíes a cada pocillo.
- f) Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C.
- g) Leer las placas después de 30 o 40 minutos, cuando se hayan sedimentado los controles. La lectura se efectuará inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de un movimiento de los hematíes en forma de lágrima. Los pocillos en los que no se haya producido la hemoaglutinación deberán presentar un movimiento similar al de los pocillos de control que no tengan virus.
- h) El título de hemoaglutinación será la mayor dilución que produzca la aglutinación de los hematíes. Puede considerarse que tal dilución contiene el título de hemoaglutinación. Otro método más preciso para determinar el título de hemoaglutinación consiste en realizar pruebas de hemoaglutinación con virus en una gama de diluciones iniciales muy cercanas entre sí por ejemplo, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, etc. Este método se recomienda para preparar con gran precisión antígeno para la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.

## **PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI)**

Reactivos



- a) Solución Salina Isotónica amortiguadora de fosfato.
- b) Fluido alantoideo que contenga el virus, diluído con solución salina isotónica amortiguadora de fosfato hasta que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación por cada 0,025 ml.
- c) Suspensión de hematíes de gallina al 1%.
- d) Suero de gallina de control negativo.
- e) Suero de control positivo.

#### Procedimiento

- a) Distribuir 0,025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (utilizar pocillos de fondo en V).
- b) Introducir 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- c) Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
- d) Añadir 0,025 ml de fluido alantoideo diluído que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación.
- e) Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C al menos durante 60 minutos o dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo.
  
- f) Añadir 0,025 de suspensión de hematíes al 1 % a todos los pocillos.
- g) Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C.
- h) Leer las placas después de 30 a 40 minutos, cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. La lectura se efectuará inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrima similar al de los pocillos de

control que contengan hematíes (0,025 ml) y solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0,05 ml) solamente.

i) El título de Inhibición de la Hemoaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa de 4 u 8 unidades de virus (en todas las pruebas deberá incluirse una titulación de hemoaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemoaglutinación necesarias.

j) La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de  $2^3$  para 4 unidades de hemoaglutinación o de  $2^2$  para 8 unidades de hemoaglutinación con el suero de control negativo y de un título de dilución inmediatamente superior o inmediatamente inferior al título conocido del suero de control positivo.

### INDICE DE PATOGENICIDAD INTRACEREBRAL (ICPI)

1. Diluir a 1:10 fluído alantoideo recogido e infeccioso (el título de hemoaglutinación deberá ser superior a  $2^4$ ) en un fluido fisiológico estéril (no podrá utilizarse antibióticos).
2. Inyectar en el cerebro de cada uno de 10 pollitos (Libres de Patógenos específicos SPF) de un día de edad es decir (24 horas y 40 horas después de salir del huevo) 0,05 ml de virus diluído.
3. Examinar las aves cada 24 horas durante 8 días.
4. Clasificar las aves en cada exámen de acuerdo al siguiente puntaje: 0=normal, 1=enferma, 3=muerta. Calcular el índice del siguiente modo:

SÍNTOMA	DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN	(Nº DE AVES)

CLÍNICO	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL
NORMAL	10	4	0	0	0	0	0	0	4x10
ENFERMA	0	6	10	4	0	0	0	0	20x1
MUERTA	0	0	0	6	10	10	10	10	46x2
									TOTAL=11 2

El índice será :el puntaje medio por ave y por observación=  $112/80= 1.4$

### TIEMPO MEDIO DE MUERTE CON DOSIS LETAL MÍNIMA

#### (TMM - DLM)

1. Diluir virus de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$
2. Inocular 6 embriones con cada dilución, comenzando por  $10^{-6}$ . La dosis fue de 0,1 ml por embrión en la cavidad alantoidea
3. Observar cada 8 horas

(La DLM es la dilución más alta en la que mueren todos los embriones del grupo)

Ejemplo de cálculo y lectura

Dilución del	Horas después de la inoculación	24	% de

virus	32 40 48 56 64 72 80 88 96	mortalidad
-10	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0
-9	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0
-8	0 0 0 0 0 3 0 0 0	50 DL50= 8
-7	0 0 0 1 1 3 1 - - -	100DLM =
-6	0 0 1 3 2 - - - - -	7 100

Suma de horas con DLM= (1x48) + (1x56) + (3x64) + (1x72)  
= 48 + 56 + 192 + 72  
= 368 (suma de horas)

TMM con DLM= Suma de horas = 368 = 61 Horas  
Nº de embriones 6



