



## BROTE DE INFLUENZA AVIAR EN CHILE 2002

Este documento recopila la información generada a partir del foco de IA del año 2002, derivada de las acciones emprendidas por el Servicio Agrícola y Ganadero para controlar la diseminación de la enfermedad en el país y alcanzar su erradicación total.

Se describen las distintas etapas y acciones llevadas a cabo. La información fue consolidada por los siguientes médicos veterinarios que participaron en la campaña (ordenados alfabéticamente):

Fuller C. Jorge  
González J. Henry  
Guerrero C. Pedro  
Herrera R. José  
Jara M. Cecilia  
Lecocq P. Claudio  
Mathieu B. Christian  
Max K. Vanessa  
Moreno Valentina  
Moreira Z. Rubén  
Reyes S. Solano  
Torres José Miguel

### Índice

<b>Participación de la industria</b> .....	2
<b>Análisis de los genes de hemoaglutininas de los aislados H7 de Chile</b> .....	10
<b>Organización de la campaña de emergencia de influenza aviar</b> .....	13
<b>Control de movimientos de productos de riesgo y vectores mecánicos en las zonas focal, perifocal y libre, de la zona amagada</b> .....	21
<b>Sacrificio, sanitización y centinelización de los focos</b> .....	24
<b>Laboratorio de diagnóstico</b> .....	32

# Participación de la industria

## 1. Descripción sintética de la industria avícola nacional

La producción avícola mundial ha tenido un importante crecimiento en los últimos años, llegando a producir 73.869.108 toneladas en el año 2002.

Chile, un país con una población total de 15.116.435 habitantes, de los cuales 13 millones corresponden a la población urbana y 2 a la población rural, cuenta con una importante avicultura, tanto industrial como familiar.

En el sector industrial las especies productivas de mayor presencia son: pollos broiler, gallinas ponedoras y pavos. Si bien las aves de corral están presentes a lo largo de todo Chile, las mayores poblaciones se concentran en las regiones V, VI y Metropolitana.

Durante el año 2002, la población total de aves comerciales se estimaba cercana a los 191 millones, considerando todos los ciclos de pollos broilers y pavos de engorda producidos, más las correspondientes aves reproductoras, y las gallinas de huevo de consumo (cuadro 1).

**Cuadro 1**  
**Existencia de gallinas y pavos (según categoría) y producción de pollos y pavos, durante el año 2002**

<b>Especie/Categoría</b>	<b>Nº Aves</b>
Gallinas reproductoras broiler	1.597.129
Pollos broiler terminados en el año	173.916.762
Pavos reproductoras	87.772
Pavos terminados en el año	6.883.007
Gallinas reproductoras de postura	82.907
Gallinas de huevos de consumo	8.678.492
<b>Total anual aves del país</b>	<b>191.246.069</b>

Fuentes: APA y ASOHUEVO

La población avícola nacional tiene una estructura sectorizada, como se detalla a continuación:

- **Sector industrial de carne de ave:** abarca cuatro grandes empresas, cuyas plantas están ubicadas en las regiones I, V, VI y Metropolitana. Éstas representan en conjunto más del 97% de la producción nacional de las carnes de pollo y pavo, lo que convierte al sector en un rubro muy competitivo e integrado en la Asociación de Productores Avícolas de Chile A.G. (APA).
- **Sector industrial de huevos:** abarca un mayor número de empresas y productores, con una distribución más extensa a lo largo del país. Las principales empresas de este sector se ubican en las regiones IV, V, VI, VII, VIII y Metropolitana; en esta última se concentran las

mayores producciones de este rubro. Una parte importante de los productores de huevos son miembros de la Asociación de Productores de Huevos ([ASOHUEVO](#)).

- **Sector industrial de otras especies avícolas:** incluye pequeños núcleos productivos de especies como codornices, avestruces, emúes y gansos, entre otros.
- **Sector familiar de aves de traspatio o de producción rural:** tiene como objetivos principales el autoconsumo y el comercio local de pollos y huevos de campo.

El sector avícola nacional es una actividad que genera un alto nivel de empleo, especialmente en zonas rurales y suburbanas; además del empleo directo, genera una gran cantidad de trabajo en sectores como transportes y servicios. El empleo total del sector avícola, sin considerar el efecto sobre el comercio y pequeños agricultores, se estima en 20.000 personas.

La producción total de carnes en Chile tuvo un extraordinario crecimiento en la década de los 90, con promedios anuales de crecimiento de 6,5%, la que llegó en el año 2001, a más de 1 millón de toneladas.



Dentro de esta área, el desarrollo más dinámico lo ha presentado la producción de carnes de ave, con aumentos anuales de 13,4%. En el año 2002 se alcanzó una producción de 437.310 toneladas de carne de pavo y pollo, que correspondió a un beneficio de 180.799.769 aves, de las cuales el 96,3% corresponden a pollos broiler y el resto a pavos (3,7%).

El sector avícola contribuye con un 43% del total de carne producida en el país, llegando a cifras de venta cercanas a los 376 millones de dólares.

El consumo de carne de ave en la población también ha tenido un crecimiento notable frente a otras carnes, incrementándose entre los años 1990 y 2001 en 20,1 kilogramos por habitante, con un consumo actual de más de 29 kg per cápita. El consumo de carne de ave representa el 39% del total de carne consumida.

El **sector avícola** lidera el mercado de las exportaciones cárnicas del país con una interesante variedad de productos que, incluida la exportación de genética, llega a más de 30 países. Los principales mercados de destino son México, Reino Unido, Unión Europea (Italia, Holanda, Bélgica, Alemania), China y Hong Kong, Uruguay, Ecuador, Perú, Guatemala, Japón, Bolivia y algunos países africanos.

En cuanto a la industria de **producción de huevos de consumo**, la población de gallinas en producción alcanza los 8.678.492 y, entre los años 1990 y 2001, se observó un crecimiento promedio anual de un 3%. En el año 2002 se produjeron 7.399.498 de cajones de 360 unidades de huevos de cáscara blanca y marrón, para el consumo fresco (92%) o uso industrial como huevo líquido (pasteurizado o deshidratado; 8%). Dicha producción fue un 34% mayor que la del año 1991.

Este aumento en la producción es concordante con un aumento en el consumo de huevo en el país que alcanzó, en el año 2002, las 177 unidades per cápita, con una variación de 23,7 entre los años 1993 y 2002.

El cuadro 2 muestra la población de gallinas de postura en el país por regiones y la producción total de huevos por unidad.

**Cuadro 2**  
**Número de gallinas de postura por región y producción durante el año 2002**

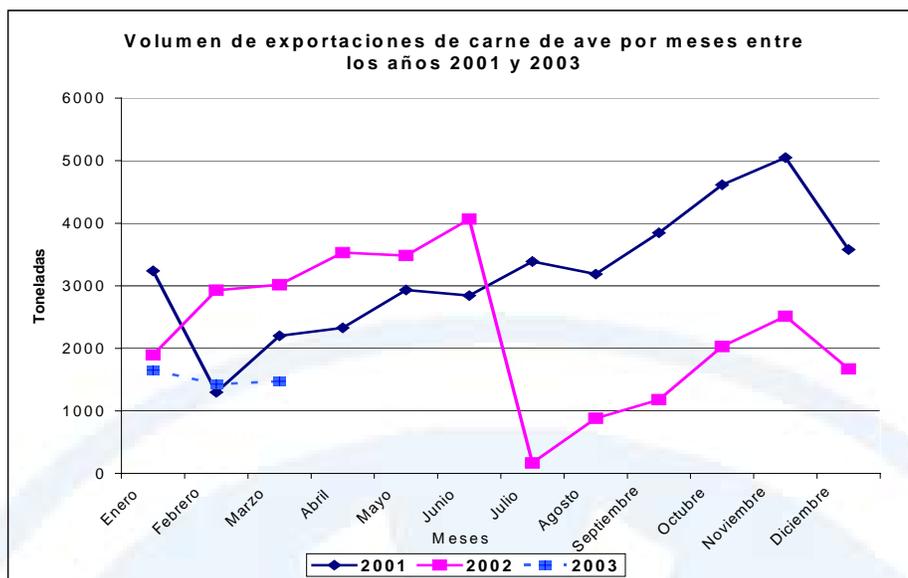
<b>Región</b>	<b>Censo</b>	<b>%</b>	<b>Nº de huevos</b>
I a IV	798.424	9,2	245.072.214
V	1.820.732	21,0	558.864.490
Metropolitana	3.988.984	46,0	1.224.398.488
VI a VII	1.111.404	12,8	341.139.844
VIII a XII	958.949	11,1	294.344.551
<b>Total gallinas de postura país</b>	<b>8.678.492</b>	<b>100,0</b>	<b>2.663.819.587</b>

Fuente: ASOHUEVO

## **2. Impacto del brote de influenza aviar sobre la industria**

El volumen de las exportaciones de carnes de pollo y pavo aumentó sostenidamente en la última década, alcanzando, en el año 2001, más de 38.376 toneladas y 58 millones de dólares. Sin embargo, en el año 2002 se produjo una fuerte disminución, debido a la presencia del brote de influenza aviar que afectó a reproductoras broilers y reproductoras pavas en la V Región del país; por ello, Chile debió suspender las exportaciones de sus productos, hasta la erradicación de la enfermedad. En el gráfico 1 se observa la brusca caída de las exportaciones durante julio de 2002.

**Gráfico 1**



Fuente: APA

De acuerdo a las tendencias de los últimos años y a la apertura de nuevos mercados, los volúmenes exportables aumentaron constantemente; fue así como los ingresos del año 2001 fueron un 60% mayor a los de 2000.

Sin embargo, en el año 2002, debido al brote de IA, los ingresos generados por el sector por concepto de exportaciones sufrieron una fuerte baja, con pérdidas económicas de EEUU \$ 11.109.434 en la exportación de carne de pollo, de EEUU \$ 7.209.118 en la exportación de carne de pavo y de EEUU \$ 4.979.148 en genética.

En otro ámbito, la industria avícola nacional venía desarrollando una interesante apertura de mercados internacionales para la exportación de material genético, lo que significaba un nivel importante de divisas para la industria. Sin embargo, esta situación también fue modificada debido a la suspensión de las exportaciones por el foco de influenza aviar.

En más de una oportunidad ha quedado de manifiesto que la producción avícola industrial y la avicultura rural campesina de Chile, son susceptibles a sufrir graves daños de su patrimonio, dada la amenaza real que representa la manifestación de enfermedades de alta morbilidad y letalidad hasta que son erradicadas, como lo fue la IA durante el año 2002 y, anteriormente, la enfermedad de Newcastle. Además, se ha observado el fuerte impacto económico que generó en la industria y en la economía nacional dicho brote de influenza aviar.



### 3. Compromiso de la industria con la sanidad avícola nacional

Es de vital importancia para la avicultura nacional el **estatus sanitario de las aves** para acceder a nuevos mercados, mantener e incrementar la comercialización de productos a los actuales clientes internacionales y mantener y mejorar la eficiencia de producción. Por este motivo, la industria avícola nacional se ha comprometido responsablemente con la condición zoonosanitaria del sector avícola, contribuyendo a la implementación y desarrollo en conjunto con el SAG del “Programa de Planteles Avícolas Bajo Certificación Oficial” (PABCO)<sup>1</sup>.

Todas las empresas exportadoras y otras están adscritas a este programa, el cual es voluntario, donde se realizan acciones conjuntas entre productores y el servicio público, con el objetivo de tomar medidas de prevención de introducción de enfermedades exóticas y de mantención de la condición sanitaria, para asegurar productos inocuos, que permitan la certificación oficial para el comercio nacional e internacional. Para cumplir los objetivos de este programa se instauraron tres planes de acción básicos:

- a. Desarrollo de planes específicos de prevención, vigilancia epidemiológica, control y erradicación de enfermedades y sistemas de aseguramiento de calidad sanitaria y agroalimentaria.
- b. Incorporación de médicos veterinarios y laboratorios acreditados por el SAG para la operación de certificación sanitaria en los planteles.
- c. Implementación de esquemas específicos de certificación sanitaria, por medio de médicos veterinarios y laboratorios acreditados, de acuerdo a los requerimientos y exigencias de los mercados.

Otro compromiso que ha adoptado la industria avícola nacional, ha sido la voluntad de cumplir con las exigencias sanitarias y, especialmente, de evaluación preventiva para IA, de los países importadores de carne de ave, para asegurar y mantener la apertura de los mercados a los productos nacionales.

---

<sup>1</sup> [www.sag.cl](http://www.sag.cl) - PABCO

La industria avícola chilena ha colaborado plenamente con las autoridades oficiales de salud animal, sometiéndose al eficiente sistema nacional oficial de prevención de enfermedades animales exóticas, con lo cual el país se ha mantenido libre de las enfermedades señaladas por la OIE. Esta excelente situación sanitaria ha permitido un prominente desarrollo de la industria avícola nacional y la apertura de mercados en todos los continentes del mundo.



#### **4. Organización de la industria en la campaña de influenza aviar**

Frente a la sospecha y confirmación del brote de IA debido a un virus H7N3, en dos planteles de la V Región, la Asociación de Productores Avícolas ([APA](#)), constituyó un equipo directivo para fijar las políticas de acción y un comité técnico coordinado por la APA y formado por profesionales especializados de la industria de aves de carne y huevos.

Adicionalmente, se estableció una alianza entre la industria y el SAG, con el objetivo de coordinar las acciones necesarias en beneficio del control y erradicación de la enfermedad del país. En este contexto, la APA y ASOHUEVO participaron activamente en dos instancias de trabajo que se generaron:

- a. El comité de emergencia público-privado, que fue dirigido por el SAG y conformado por APA, ASOHUEVO, Colegio Médico Veterinario, AMEVEA y universidades. Sus objetivos fueron los siguientes:
  - Realizar intercambio de información, planteamiento y coordinación de iniciativas y acciones.
  - Establecer un grupo de profesionales y técnicos con dedicación exclusiva a la campaña para la erradicación de la IA. Para esto, la APA brindó apoyo directo a través de recursos económicos.
  - Obtener asesoría internacional a través del financiamiento de la visita de expertos.
  - Capacitación de los profesionales del sector público para el desarrollo de la campaña.

- b. Establecer la comisión de colaboración técnica nacional e internacional, en la cual participó la industria avícola representada por los médicos veterinarios del sector, AMEVEA y la Universidad de Chile. Los principales objetivos de esta comisión fueron:
- Dictar pautas y medidas de acción para la industria, tendientes a cumplir los objetivos acordados en el comité de emergencia público-privado.
  - Realizar revisiones periódicas de las informaciones entregadas por cada sector.
  - Divulgar la información de la situación actualizada, a través de boletines informativos dirigidos a todos los sectores involucrados.

## **5. Acciones realizadas por la industria**

La industria avícola se organizó internamente, fue liderada por la APA y participó ASOHUEVO en los aspectos técnicos y económicos. Se desarrollaron las siguientes acciones:

- a) Estructuración de comisiones técnicas internas y sectoriales.
- b) Reuniones periódicas entre todas las empresas e instituciones involucradas.
- c) Divulgación de la información en forma oportuna.
- d) Reforzamiento de las medidas de bioseguridad establecidas por el comité técnico.
- e) Implementación de todas las medidas sanitarias acordadas con el SAG.

## **6. Evaluación de la organización público-privada en la campaña de la IA**

La evaluación que se hizo al desempeño de la industria avícola ante la crisis sanitaria, en relación con la capacidad organizativa, de toma de decisiones y accionar conjunto, consideró los siguientes factores:

- La industria avícola nacional tuvo que afrontar el alto costo económico que significó el brote de IA en el financiamiento de las medidas adoptadas que estuvieron orientadas a controlar, evitar la diseminación y erradicar la enfermedad del país; entre ellas, debió asumir las pérdidas por sacrificio de las aves de los planteles amagados por la enfermedad y el gran costo por el cierre de los mercados externos a la exportación de los productos cárnicos avícolas.
- Si bien la empresa afectada debió asumir el costo total del sacrificio de las aves de los planteles amagados, se generó un apoyo solidario de la industria avícola sectorial, que ayudó a mitigar el perjuicio de ésta.

Como consecuencia del eficiente manejo de la crisis por parte de todas las instituciones involucradas, con fecha 20 de diciembre de 2002, se publicó en el sitio Web de la OIE el documento que declara a Chile como país libre de influenza aviar. Este reconocimiento favoreció la rápida apertura de los mercados internacionales para la exportación de carne de pollo y pavo nacional y, además, es un antecedente positivo para seguir con las negociaciones tendientes a abrir nuevos mercados.

Se evaluó en forma positiva la actitud de la industria avícola en conjunto con el sector público y con perspectivas a la futura apertura de mercados internacionales. Esto permitió el respaldo y optimismo de diferentes sectores para la rápida apertura de los mercados internacionales.

## **7. Actividades de la industria posteriores a la campaña**

El sector productor de carne de aves, ha generado acuerdos entre sus miembros para adoptar las medidas de bioseguridad y manejo operativo de sus procesos de producción de aves vivas, que ayuden a minimizar la presentación de enfermedades catastróficas y a favorecer medidas de detección y control precoz.

Las asociaciones de los productores han realizado reuniones técnicas de trabajo con sus profesionales, representantes del SAG, de AMEVEA-Chile y de universidades con el fin de emprender acciones conjuntas tendientes a establecer estrategias de prevención de enfermedades exóticas

La situación vivida por la industria avícola nacional puso en evidencia la fragilidad del país frente a la emergencia de enfermedades catastróficas, como enfermedad de Newcastle e influenza aviar. Ello demostró la necesidad de fortalecer el programa de vigilancia epidemiológica para la detección precoz de enfermedades exóticas.

## **8. Proyecciones de la industria frente a IA**

La crisis provocada por el brote de IA en la industria avícola nacional se ha transformado en una fortaleza para el sector, debido a:

- La seriedad y transparencia demostrada a la comunidad científica y mercados de exportación.
- La colaboración y disposición de la empresa afectada por las medidas sanitarias impuestas debido al brote.
- La exitosa erradicación del brote de IA, sin propagación desde la granja afectada.
- El brote de una enfermedad exótica y desconocida en Chile, precozmente diagnosticada, puso a prueba un exitoso programa de erradicación, el cual ha tenido un notable reconocimiento internacional.

## Análisis de los genes de hemoaglutininas de los aislados H7 de Chile

El análisis filogenético del gen de hemoaglutinina aislado en Chile, comparado con 110 secuencias conocidas de aislados de H7, indican que el virus estaría agrupado con un linaje aviar de Norteamérica. Los virus de Chile fueron muy distintos a los de cualquier otra secuencia previamente establecida y observada en el árbol filogenético (anexo 1).

La alineación de secuencia en parejas muestra alrededor de un 20% o más de diferencias con las secuencias de los aislados norteamericanos. La divergencia es mayor comparada con la del linaje eurasiático del virus, con diferencias de secuencia promedio de un 30%.

El primer aislado CK/Chile/176822/02, fue clasificado como de baja patogenicidad de acuerdo a los estándares del test de patotipificación y tenía tres aminoácidos básicos en el sitio de clivaje (posiciones -1, -3 y -5). Esta secuencia podría ser predictiva de baja patogenicidad.

Los otros aislados tienen una inserción de diez aminoácidos en el sitio de clivaje (entre el aminoácido -1 y -2). La inserción de aminoácidos adicionales en el sitio de clivaje es una de las dos vías más comunes para que un virus cambie de baja a alta patogenicidad, y esto puede ocurrir en un simple paso.

Aislado	Secuencia
CK/Chile/176822/02	PEKPKTR/G
CK/Chile/4322/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G
CK/Chile/4325/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4345/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G
CK/Chile/4346/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4347/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4348/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4418/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G
CK/Chile/4458/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4957/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4966/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G
CK/Chile/4968/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G
CK/Chile/4977/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G

Una diferencia observada en los aislados es que algunos de ellos tenían un ácido glutámico en la posición -3 y los otros una lisina. El resto de los insertos eran iguales.

El virus de baja patogenicidad tuvo una inclusión de 30 nucleótidos insertados en el sitio de clivaje, resultando en un virus de alta patogenicidad. Los cambios en el virus resultaron a partir de dos variantes de virus con el ácido glutámico o lisina en posición -3 en el sitio de clivaje.

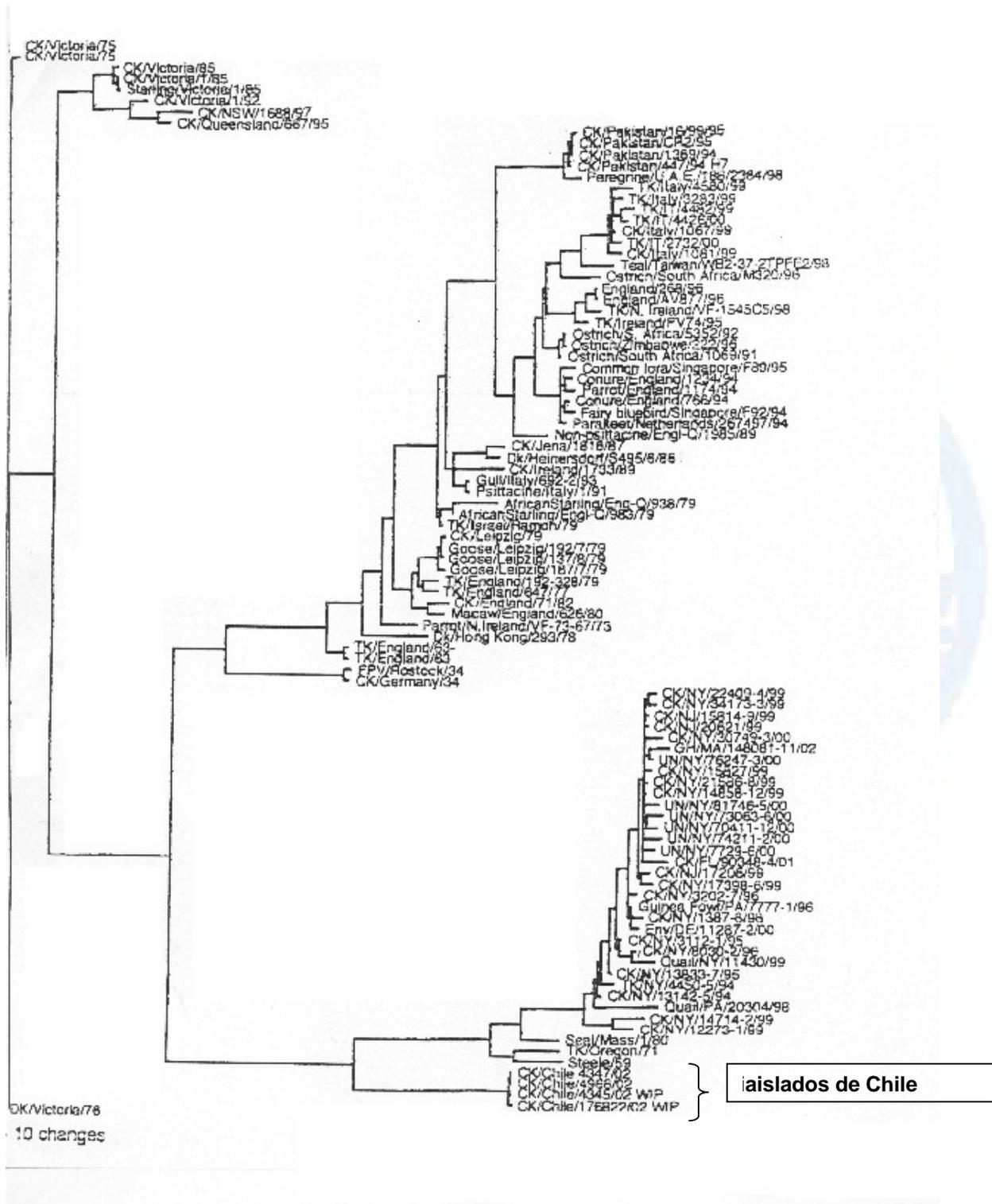
## Análisis de otros genes

La matriz génica para CK/176822/02 se agrupa con el linaje norteamericano. El virus está más relacionado con el Turkey/OR/71 con un 96,3% de homología de secuencia. El gen no estructural también se agrupa con el linaje norteamericano subtipo B, estando más estrechamente relacionado con Turkey/Canadá/63.

<b>ID</b>	<b>National Veterinary Services Laboratories (Ames, Iowa, Usa)</b>	<b>Southeast Poultry Research Laboratory ( Athens, Georgia, Usa)</b>	<b>Veterinary Laboratories Agency (Weybridge, Uk)</b>
176822/02		PEKPKTR/G	PEKPKTR/GLF
4322/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF		PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF
4325/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF GAI		PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4345/02	PEKPKT <u>CSP?SRCRETR</u> /GLF GAI	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /G	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF
4346/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF GAI		PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4347/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF GAI	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4348/02			PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4418/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF		PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF
4458/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF GAI		PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4957/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF		PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4966/02	PEKPKT <u>CSPLFRCRETR</u> /GLF GAI		PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF
4968/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /G	PEKPKT <u>CSPLSRCRKTR</u> /GLF
4977/02	PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF		PEKPKT <u>CSPLSRCRETR</u> /GLF

# Anexo 1

## Árbol filogenético del gen de hemaglutinina



# Organización de la campaña de emergencia de influenza aviar

## 1. Introducción

La organización de la campaña de emergencia inicialmente estuvo dirigida a establecer los equipos de trabajo a nivel local y nacional, así como a analizar la información preliminar disponible del evento.

En Chile no se había presentado una emergencia sanitaria desde el año 1987 (fiebre aftosa), y en el país nunca se había detectado influenza aviar.

Se trabajó con gran profesionalismo y con una meta clara: controlar y erradicar la enfermedad en el más breve plazo posible, a objeto de declarar el país nuevamente libre de influenza aviar.

## 2. Organización de la Campaña de IA

### 2.1 Campaña en la zona amagada

#### Objetivo

Una vez implantada la emergencia sanitaria se puso en marcha el [Plan Maestro del Sistema Emergencial Pecuario](#), el que facilitó la estructura operativa, estratégico-táctica y los planes de acción específicos, que permitieron una rápida y eficiente respuesta, ante la aparición en el territorio nacional de la IA, enfermedad exótica para Chile.

Además, se instituyó el Plan de Contingencia de IA, que tuvo como objetivo poner en práctica las medidas de control y erradicación específicas para esta enfermedad, adoptándose todas las acciones sanitarias pertinentes ([Manual Operativo para el Manejo de la IA](#)).

#### Definición de zona amagada

La zona amagada se definió considerando algunos parámetros de territorialidad (10 km de diámetro) y ciertas características de delimitación geográfica (accidentes naturales, vías de comunicación y otros), que permitieron controlar en mejor forma la emergencia.

La zona amagada estuvo compuesta por una **zona focal** que incluía los dos planteles afectados y una **zona perifocal**; en ambas se facultó la aplicación de medidas sanitarias de acuerdo a las normas establecidas en la legislación vigente, tales como aislamiento de aves, cuarentenas, restricciones de movimiento, desinfecciones, sacrificio de aves enfermas o sospechosas, colecta de muestras y atención de denuncias de enfermedades, entre otras.

#### Etapas de la Campaña

La Campaña de Control y Erradicación de Influenza Aviar se dividió en cuatro etapas:

- emergencia sanitaria;
- limpieza y desinfección (saneamiento);

- regionalización – zonificación;
- declaración de país libre de IA.

La primera etapa de **emergencia sanitaria** consistió en el control de focos, a través del sacrificio sanitario y entierro de la totalidad de las aves en cada uno de los sectores afectados.

Se realizó rastreo y seguimiento epidemiológico de todos los planteles industriales de aves y agrupaciones (clusters) de aves de traspatio, así como de aves silvestres y acuáticas en la zona amagada. Además se fortaleció la vigilancia epidemiológica activa y pasiva (atención de denuncias) y la ejecución de monitoreos y catastros avícolas.

Se incrementaron las medidas de bioseguridad en la totalidad de los planteles avícolas industriales de la zona amagada.

La segunda etapa de **limpieza y desinfección** se basó en labores de limpieza, desinfección, tratamientos a la cama y guano de los sectores afectados y su disposición final en los mismos predios. Se establecieron procedimientos y cronogramas para cada una de las labores, incluido un esquema de centinelización, a objeto de confirmar la ausencia de actividad viral.

La tercera etapa de **regionalización o zonificación** estableció un esquema de regionalización sobre la base de los principios de la OIE, con el objetivo de reestablecer el comercio de productos avícolas desde Chile. Este procedimiento estableció una zona de erradicación (zona amagada por la enfermedad) y una zona libre (resto del territorio nacional no afectado). Este proceso fue aceptado por la Unión Europea y formó parte del restablecimiento de las relaciones comerciales para productos avícolas con ese bloque.

La cuarta y última etapa de la campaña fue la **declaración de país libre de IA**. Esta etapa concluyó en diciembre del año 2002, una vez que se cumplió con lo normado en el capítulo respectivo del Código Zoonosario Internacional (OIE).



## Estructura

Se dispuso un grupo de respuesta inmediata en la zona amagada, que contempló un **Centro Operativo de Emergencia** localizado en la zona y separado de la oficina sectorial del SAG. Este centro atendía territorialmente a esa zona, a objeto de dar autonomía a los equipos de emergencia y para no dificultar las acciones por el trabajo rutinario de la oficina local.

El Centro Operativo estaba conformado por un responsable (Jefe de Campaña Local), del cual dependía una serie de brigadas operativas de profesionales y técnicos. Este jefe reportaba, al Centro Nacional de Emergencia (Jefe Nacional de Campaña), las acciones desarrolladas a nivel local y manejaba y coordinaba la aplicación de las medidas sanitarias dispuestas en el evento.

En el Centro de Operaciones se conformaron equipos de personal oficial para realizar sacrificios sanitarios, cuarentenas, vigilancia activa de aves comerciales y de traspatio, atención de denuncias y otros dos equipos encargados de la bioseguridad y del análisis epidemiológico del evento.

## Recursos financieros y humanos

Los recursos dispuestos para esta emergencia emanaron del presupuesto normal del SAG, complementado con asignaciones extraordinarias del Ministerio de Agricultura, y el aporte de la Asociación de Productores Avícolas de Chile (APA).

Durante la emergencia sanitaria, se trabajó en estrecha coordinación con el sector privado nacional. Se fortaleció la articulación público-privada entre el Estado y las Asociaciones Industriales, como APA y ASOHUEVO (Asociación de Productores de Huevos de Chile).

También se contó con asesoría de expertos nacionales e internacionales, que validaron la estrategia técnica desarrollada en Chile y se trabajó con la Agrupación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura (AMEVEA) y académicos de universidades.

En Chile no existe un fondo de indemnización para emergencias de este tipo, por lo tanto, las pérdidas económicas por la IA fueron asumidas en su totalidad por el sector privado afectado.

## Recursos técnicos

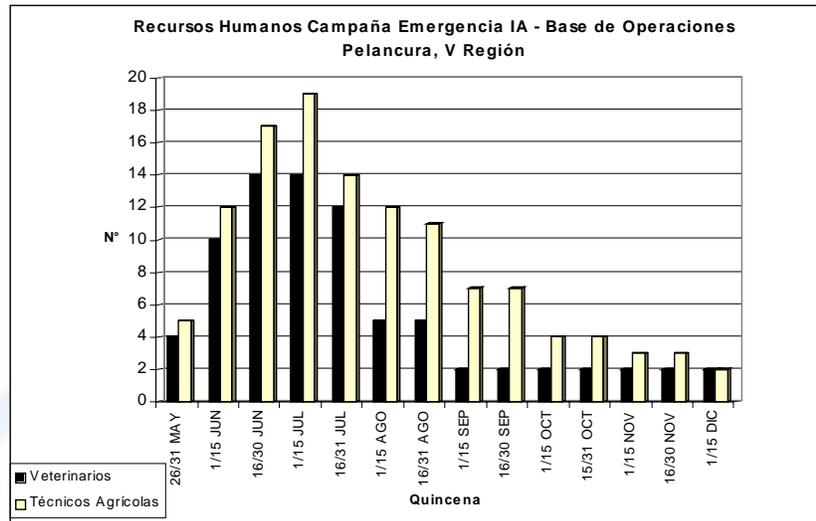
Los recursos técnicos utilizados durante la Campaña fueron empleados en la zona amagada, para apoyar las labores específicas de foco y perifoco.

Los equipos de trabajo se constituyeron con personal SAG de diversas regiones del país, además de profesionales y técnicos contratados específicamente para la Campaña.

Personal asignado a la zona amagada:

PERSONAL	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	TOTAL
Médicos veterinarios	4	12	13	5	2	2	2	2	42
Técnicos	5	15	17	12	6	6	6	4	71
Administrativos	1	3	2	2	2	2	2	2	16

El personal dedicado específicamente a las labores de la Campaña de IA, en la zona amagada, alcanzó su máximo durante los meses de junio y julio, cuando se realizaron labores de control de foco.



### Líneas de acción o actividades realizadas

Se establecieron las siguientes acciones sanitarias a nivel de foco y perifoco en la zona amagada:

- Cuarentena permanente en los focos.
- Instalación de barrera sanitaria con personal oficial.
- Sacrificio y entierro, en fosa sanitaria, de la totalidad de las aves afectadas.
- Desinfección y sanitización de sectores afectados.
- Incremento de medidas de bioseguridad en planteles industriales.
- Rastreo epidemiológico en planteles comerciales, aves de traspatio, aves silvestres y productos biológicos.
- Muestreo serológico de la zona amagada cada siete días en un inicio, y luego cada 15 días (planteles comerciales).
- Catastro avícola.
- Zona de control sanitario en un radio de 10 km alrededor de los focos.
- Control y restricción de movimientos de aves y subproductos.
- Supervisión de despachos a matadero.
- Atención de denuncias de mortalidad de aves.

## 2.2 Campaña en el resto del país

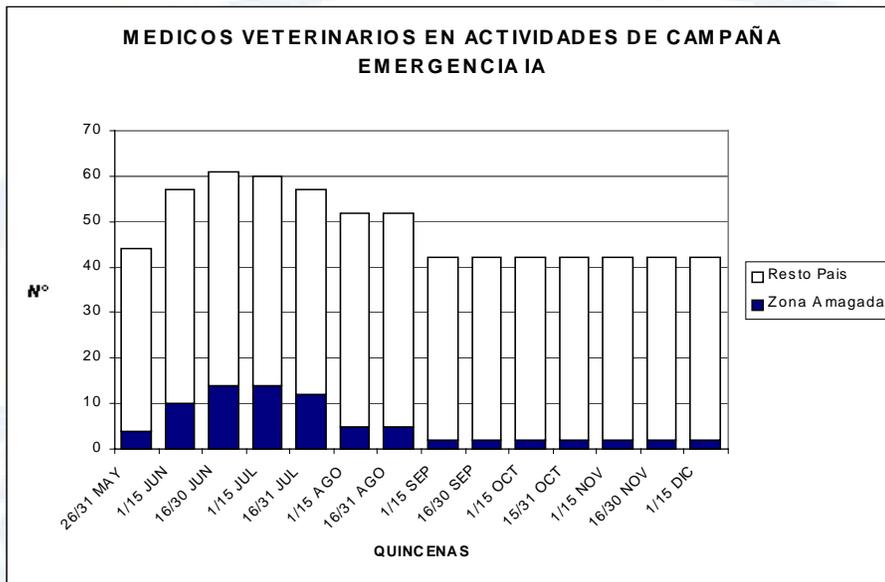
La Campaña de Erradicación de IA también se estableció a nivel nacional con las cuatro etapas mencionadas anteriormente (emergencia sanitaria, limpieza y desinfección, regionalización-zonificación y declaración de país libre de IA).

Durante la **etapa de emergencia sanitaria** trabajaron profesionales del Servicio de todas las oficinas del SAG a lo largo del país.

La cantidad de médicos veterinarios dedicados a la campaña de IA en el país se resume en el cuadro siguiente:

PERSONAL	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	TOTAL
Médicos veterinarios	40	47	47	45	39	39	39	39	335

Durante junio y julio se incrementaron enérgicamente las acciones de vigilancia, monitoreo, muestreo, bioseguridad y atención de denuncias, entre otras. Además, se ejecutó el diagnóstico de situación epidemiológica del país, a través del primer monitoreo serológico nacional.



**Las acciones realizadas en el resto del país fueron las siguientes:**

- Comunicación a todas las oficinas SAG de la emergencia.
- Monitoreo nacional de IA para conocer el status sanitario de toda la población avícola del país (industriales, traspatio, silvestres y acuáticas).
- Catastro nacional de planteles y de aves.
- Incentivo de la atención de denuncias por sospecha de IA o por otras causas.
- Incremento y mantención de medidas de bioseguridad estrictas en la totalidad de los planteles industriales.

En la etapa de **limpieza y desinfección** (saneamiento), se continuaron realizando las mismas labores que en la primera fase de la emergencia. Se creó un protocolo de tratamiento de la cama y guano y de las actividades de limpieza y desinfección de los galpones.

Durante la **regionalización – zonificación**, se definió la zona libre como el resto del territorio nacional. En ella se realizaron las siguientes acciones dirigidas a mantener la alerta sanitaria:

- Sistema de detección precoz con monitoreos de vigilancia activa.
- Vigilancia pasiva permanente.
- Prevención de ingreso del virus IA mediante el sistema cuarentenario.
- Incremento y mantención de la bioseguridad en plantales comerciales.
- Realización de catastros avícolas.
- Divulgación de las medidas adoptadas en todo el país.

### **Asesorías de expertos internacionales**

Durante el evento de la emergencia sanitaria, el SAG solicitó formalmente a la OIE el envío de una misión para auditar, verificar y apoyar la situación de la IA en Chile, así como las medidas de control que se estaban implementando. De este modo, durante julio de 2002 estuvieron en Chile la viróloga Dra. Ilaria Capua y el epidemiólogo Dr. Stefano Marangon, del Instituto Zooprofiláctico Experimental de Venecia, centro de referencia de la OIE para IA.

Durante su visita, los expertos de la OIE evaluaron el accionar del Servicio Veterinario Oficial de Chile, visitando las oficinas del SAG y el nivel central. Evaluaron también, el funcionamiento de la industria avícola nacional, para lo cual visitaron las industrias afectadas y sostuvieron reuniones con los encargados de las empresas y sus asociaciones.

Los especialistas pudieron conocer todas las labores realizadas durante la emergencia, y apreciaron su efectividad; concluyeron que el accionar realizado fue el adecuado y recomendaron modificar sólo algunos puntos menores para alcanzar un mejor accionar. Las recomendaciones de los especialistas de la OIE fueron adoptadas y llevadas a cabo a la brevedad.

En su informe los especialistas destacan las siguientes conclusiones preliminares:

- Las medidas de control y erradicación de la enfermedad, efectuadas por el SAG, fueron adecuadas. La estrategia de despoblación de las aves en los dos focos, junto con la desinfección y limpieza de los sitios, permitieron la no-diseminación de la enfermedad.
- Sobre la base de los resultados de los monitoreos efectuados y de las medidas implementadas en toda la industria avícola nacional, el brote de IA se encontraría limitado.
- Los plantales que presentaron serología positiva a IA, sin la presencia de signos clínicos, fueron puestos bajo vigilancia oficial y las medidas de prevención adoptadas fueron las adecuadas.

### **3. Regionalización o zonificación del país**

Una vez finalizadas las labores de sacrificio sanitario e iniciadas las de limpieza y desinfección de los sectores afectados, y después de la ejecución de dos monitoreos nacionales con resultados negativos, se decidió zonificar el país, según las bases que la OIE recomienda.

La zonificación se formalizó el mes de septiembre de 2002, transcurridos tres meses desde el último caso clínico de IA en el país y luego del sacrificio y enterramiento de la totalidad de las aves afectadas.

La aprobación del esquema de zonificación presentada por Chile a las autoridades de salud animal de la Unión Europea, significó para el país, la reapertura del mercado internacional para las exportaciones avícolas desde la zona libre de IA.

El SAG responsablemente tomó la determinación de zonificar el país y, en función de ésta, establecer la estrategia de erradicación final de la IA desde territorio nacional, el que contempló la formalización de dos zonas delimitadas.

Se estableció una nueva zona de erradicación (zona infectada y zona de vigilancia), basada en las características geográficas de la zona afectada, y una zona libre de IA, la cuál nunca presentó casos de la enfermedad, que estaba constituida por el resto del territorio nacional.

La zona infectada, dentro de la zona de erradicación, tuvo como objetivo primordial eliminar cualquier riesgo de diseminación de la enfermedad fuera de esta área. Por esta razón se efectuaron labores permanentes de cuarentenas oficiales a los planteles declarados focos y en aquellos denominados sospechosos, es decir, los que hubiesen evidenciado serología positiva, sin evidencias clínicas y negativos a los intentos de aislamiento viral, en los muestreos previos.

Luego de los procesos de limpieza y desinfección de los sectores afectados, se realizó un proceso de verificación de ausencia viral en los galpones, mediante la utilización de aves centinelas.

En la zona de vigilancia, también inserta en la zona de erradicación, se realizaron actividades de muestreos de vigilancia, registros de mortalidad y postura de aves, registro de temperatura de guanos y camas procesadas, solicitudes de movimiento, destino y comercialización de éstos. Hubo restricciones de movimiento durante todo el período.

#### **4. País libre de IA**

A mediados de diciembre de 2002 el país se volvió a declarar libre de IA, después de siete meses de haberse detectado la enfermedad; este fue un tiempo considerablemente breve en el control de esta patología de alta transmisibilidad y mortalidad.

Una vez efectuada la declaración de país libre de IA, se abordó el tema de la reapertura de mercados internacionales para las exportaciones nacionales avícolas que todavía poseían trabas; de esta manera, Chile fue visitado por expertos internacionales que vinieron a auditar las acciones realizadas por el SAG y la industria privada, entre estas delegaciones, destacan la de México, Argentina, Guatemala, Costa Rica y Bolivia.

#### **5. Evaluación de la Campaña**

Una vez finalizada la Campaña de Erradicación de IA, se realizó un análisis de los logros obtenidos y de las posibles falencias observadas, a fin de aprender de la experiencia vivida.

#### **6. Actividades posteriores a la Campaña**

Una vez finalizada la Campaña de Erradicación de IA, Chile se declaró nuevamente libre de todas las enfermedades de la Lista A de la OIE.

Luego de un análisis retrospectivo, el SAG decidió modificar algunas de sus legislaciones y aplicar una nueva estrategia política para la prevención de IA, así como también para otras enfermedades aviarias.

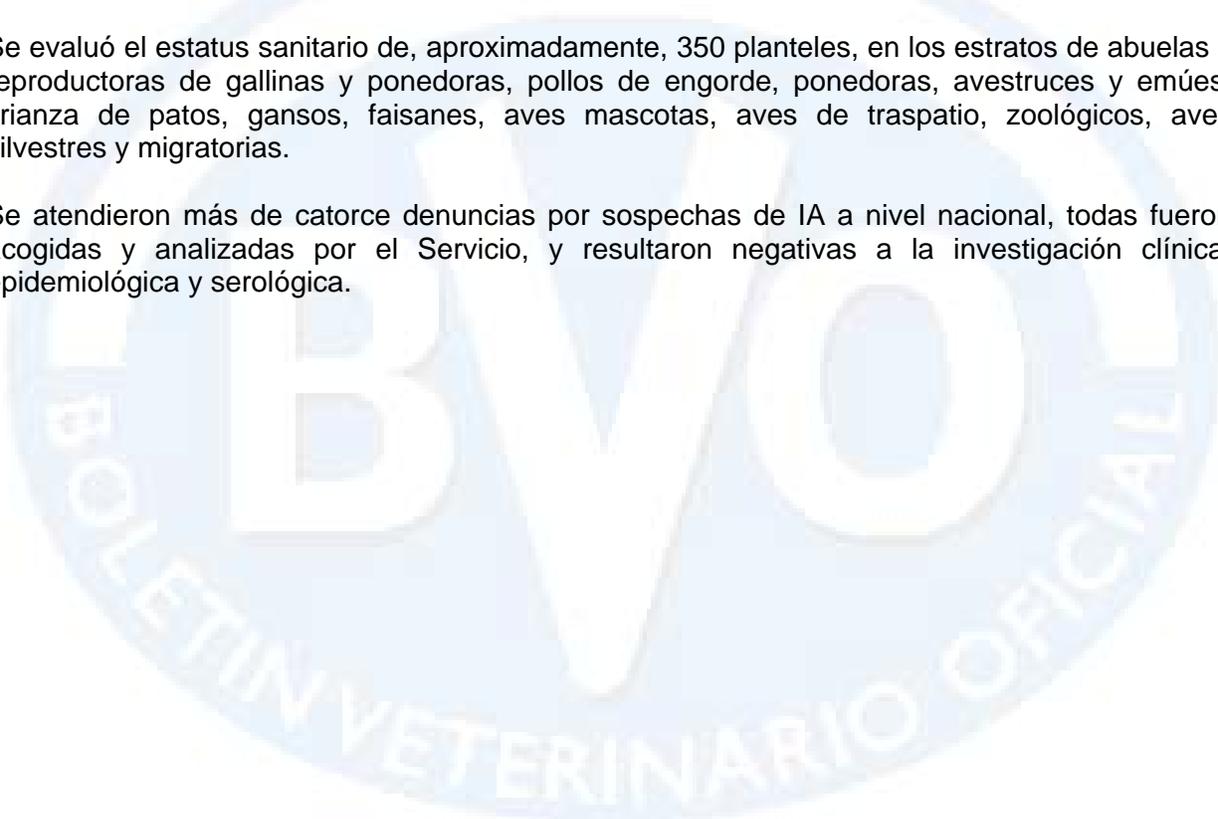
Además, se establecieron reuniones sistemáticas con el personal involucrado para crear una propuesta de políticas post erradicación de influenza aviar.

## **7. Conclusiones**

Los tres monitoreos serológicos aplicados durante la Campaña como parte de la vigilancia epidemiológica (junio, agosto y noviembre-diciembre de 2002), arrojaron resultados negativos a la IA en todas las regiones; se procesaron más de 187.000 muestras.

Se evaluó el estatus sanitario de, aproximadamente, 350 planteles, en los estratos de abuelas y reproductoras de gallinas y ponedoras, pollos de engorde, ponedoras, avestruces y emúes, crianza de patos, gansos, faisanes, aves mascotas, aves de traspatio, zoológicos, aves silvestres y migratorias.

Se atendieron más de catorce denuncias por sospechas de IA a nivel nacional, todas fueron acogidas y analizadas por el Servicio, y resultaron negativas a la investigación clínica, epidemiológica y serológica.



# Control de movimientos de productos de riesgo y vectores mecánicos en las zonas focal, perifocal y libre de la zona amagada

## 1. Guano

**Zona focal:** el guano de aves que se encontraba al interior de los sectores afectados se mantuvo sin movimiento por 30 días; posteriormente se le aplicó un producto viricida y se acumuló en bardas al centro del galpón, por un período de 21 días. Simultáneamente, se controlaba la temperatura en tres puntos de la barda (centro y en los dos extremos). Se cerraron las puertas y se bajaron las cortinas de los galpones afectados, controlándose el acceso de personas; sólo podían ingresar aquellas autorizadas para las actividades de limpieza y desinfección. Finalmente, el guano se enterró en fosas dentro del mismo establecimiento y no se autorizó la venta ni los movimientos de este material.

**Zona perifocal:** los movimientos del guano de ave sólo se permitieron bajo estrictas condiciones de bioseguridad y con supervisión del SAG; éste se acopiaba por un período mínimo de 7 días y se buscaba que alcanzara una temperatura mínima de 45 °C. Luego, la venta se llevaba a cabo con autorización del SAG, registrándose los datos correspondientes al número de patente del vehículo, nombre del chofer y toneladas cargadas, entre otros. El traslado se llevaba a cabo con el camión cubierto con malla de polietileno (raschel), a fin de evitar el desprendimiento del material de carga.

**Zona libre:** el movimiento del guano era libre y sin restricciones por parte del SAG, a excepción de las de orden tributario que obligan a portar una guía de despacho. Sólo en algunos establecimientos existieron restricciones, debido a que, inicialmente, algunas muestras fueron reactivas positivas. Esta condición se debió a la aplicación de la vacuna contra hepatitis a Cuerpo de Inclusión contaminada por antígeno IAH5.

## 2. Huevos

**Zona focal:** destrucción y entierro en fosas sanitarias, dentro del mismo sector afectado, a las cuales se les aplicaba cal.

**Zona perifocal:** autorización previa del SAG para llevar a cabo movimientos, entre la zona perifocal y la zona libre, en el caso de huevos fértiles.

**Zona libre:** sin restricciones especiales de origen sanitario.

## 3. Productos Biológicos

En los planteles afectados se requisaron los productos biológicos que no contaban con los registros respectivos autorizados en el SAG o en el Instituto de Salud Pública (ISP). Éstos se remitieron al Laboratorio Oficial del SAG para los correspondientes análisis. Las cámaras frigoríficas y los estantes de almacenamiento de biológicos fueron sellados por el SAG.

#### 4. Personal de las empresas afectadas

Con el fin de rastrear los movimientos del personal que trabajó directamente con las aves afectadas, se obtuvo una lista completa del personal a cargo de las diversas actividades al interior del establecimiento. Cada uno de los empleados se visitaron en sus casas particulares y se verificó la presencia o ausencia de aves en sus domicilios; se colectaron muestras de las aves de las cercanías.

#### 5. Vehículos

**Zona focal:** fueron instauradas barreras de control sanitario en las puertas de ingreso de los establecimientos afectados, donde se instalaron maquinarias de fumigación para desinfectar todos los vehículos que ingresaran o salieran de los establecimientos. Además se restringieron los movimientos de ingreso y egreso, verificándose la salida de materiales biológicos. Además, la barrera poseía un registro de ingreso y egreso de vehículos y de visitas y, en general, de todos los movimientos que se llevaran a cabo a través de ella. Por último, los establecimientos incrementaron las medidas de bioseguridad.

**Zona perifocal:** no hubo restricción de movimientos de vehículos; no obstante, las empresas avícolas de la zona aumentaron las medidas de bioseguridad en el ingreso a los establecimientos, junto con el control de los vehículos que ingresaban a los diferentes establecimientos.

#### 6. Aves vivas

**Zona focal:** a las aves afectadas en los dos focos se les aplicó sacrificio sanitario (Stamping out) con CO<sub>2</sub> y se procedió a su entierro en fosas sanitarias ubicadas a un costado de los pabellones afectados. En el caso de Tremolén, las aves ubicadas al interior del establecimiento, que no fueron afectadas por la enfermedad, registraron movimientos con estrictas medidas de bioseguridad, lo que permitió mantener su condición sanitaria.

Con respecto a estas medidas, existieron dos excepciones dadas por la salida de las aves que provenían de huevos fértiles que habían sido puestos por aves del interior de Miltil y Tremolén. En el primer caso, los pollitos provenían de huevos puestos por aves que efectivamente enfermaron. En el caso de Tremolén los pavitos provenían de huevos puestos por aves que no enfermaron, ni presentaron serología positiva en algún momento.

Ambos traslados se llevaron a cabo bajo estrictas medidas de bioseguridad y las aves fueron monitoreadas y chequeadas permanentemente. En el caso de los pollitos que provenían de Miltil, llegaron a predios que fueron cuarentenados. Fue evaluado el nivel de riesgo de las plantas de incubación de ambos predios (Miltil y Tremolén) para autorizar el movimiento de aves.

**Zona perifocal:** el traslado de aves se llevó a cabo con restricciones y autorización del SAG y el envío a matadero se realizó bajo la supervisión del personal del Servicio. En el caso de sectores seropositivos que enviaron aves al matadero, estos envíos se llevaron a cabo luego de la ejecución de un plan de bioseguridad, bajo supervisión de personal del SAG, que, entre otras cosas, incluía la aplicación de un viricida a las aves, la colocación de malla raschel en los camiones para evitar el desprendimiento de plumas en el trayecto y la limitación de la cantidad

de aves que eran enviadas a matadero. Esta consistió en impedir que se enviaran a matadero un número mayor de aves que las que un solo turno de faena podía procesar.

## 7. Médicos Veterinarios

**Zona focal:** desde que se definió el problema como influenza aviar, los médicos veterinarios de la empresa privada, así como los del SAG, mantuvieron contacto sólo con un plantel. En el caso de tener que visitar otro plantel, ello no se realizó con menos de 72 horas de diferencia entre uno y otro. Además, se tomaron las precauciones de desinfectar adecuadamente los equipos, de utilizar ropa desechable y botas de plástico limpias, entre otros.

**Zona perifocal:** los médicos veterinarios del SAG que recorrieron esta zona cumplieron con un plan de bioseguridad que incluyó la desinfección de utensilios y la utilización de material desechable para la toma de muestra. En la base de operaciones se procedía a fumigar en cámara con formalina la ropa y los utensilios reutilizables y se incineraban los elementos desechables. Los vehículos eran desinfectados y fumigados tanto a la entrada como a la salida de la zona.

## 8. Toma de muestras

La recepción de muestras en la base de operaciones se llevaba a cabo previa fumigación de los vehículos que las transportaban. Se registraban los datos y las muestras eran manipuladas lo mínimo posible para lograr un rotulado e identificación adecuados.

Todos los manejos se llevaban a cabo en una sala especial para dichos efectos y el material desechable utilizado era incinerado. En el Laboratorio los materiales de traslado eran incinerados.

# Sacrificio, sanitización y centinelización de los focos

## 1. Sacrificio

**Foco 1 (Miltil):** el sacrificio y destrucción de las últimas aves se efectuó el 8 de junio de 2002. El procedimiento utilizado fue la aplicación de gas dióxido de carbono, directamente en cada uno de los pabellones. Se sacrificaron, en total, 465.000 gallinas.

**Foco 2 (Tremolén):** el sacrificio y destrucción de las últimas aves, se efectuó el 19 de junio de 2002, con el mismo procedimiento anterior. Se sacrificaron, en total, 18.000 pavos.

## 2. Sanitización, desinfección y verificación de la ausencia de actividad viral en sectores infectados

Se definieron seis etapas o actividades principales en el marco del proceso de sanitización de los sectores infectados por el virus de la IA:

- compostaje del guano y cama;
- entierro y disposición final del compostaje;
- lavado de los pabellones y equipos;
- desinfección;
- período de silencio;
- centinelización.

El cronograma de este proceso, así como los procedimientos de limpieza y desinfección se explicitan en los anexos 1 y 2.

### 2.1 Compostaje del guano y cama

El proceso de compostaje se inició una vez concluido el sacrificio de la totalidad de las aves presentes en los respectivos galpones. En el establecimiento Miltil (foco 1), este proceso se extendió entre el 15 de junio y el 11 de agosto de 2002; en Tremolén (foco 2) se inició el 24 de agosto y finalizó el 25 de septiembre de 2002. En este punto es fundamental el control de la temperatura alcanzada y el período de tiempo necesario para una adecuada fermentación.

### 2.2 Entierro y disposición final del compost

El entierro adecuado de la totalidad del guano fermentado se llevó a efecto en un área dentro del mismo establecimiento, correspondiente a la base de una quebrada natural, cuyo tránsito fue realizado a través de un “camino sucio”.

### 2.3 Lavado de pabellones y equipos

Este proceso se realizó en el 100% de los pabellones y equipos utilizados en el manejo productivo de las aves (anexo 2).

## **2.4 Desinfección**

La cobertura de desinfección abarcó a todos los pabellones, equipos y materiales utilizados, tanto interna como externamente en los sectores afectados (anexo 2).

## **2.5 Período de silencio**

Tiempo definido una vez concluida las actividades de desinfección final y disposición de los desechos y compostaje.

## **2.6 Centinelización**

La verificación de ausencia de actividad viral, se efectuó mediante el poblamiento de los diversos sectores afectados con aves susceptibles y comprobadamente negativas a IA. Las aves se controlaron en su establecimiento de origen entre 7 a 14 días previos a su traslado.

El traslado de aves centinelas a los diversos sectores del plantel Miltil se realizó entre el 7 y el 29 de octubre de 2002; en el plantel de Tremolén, el traslado de pavos susceptibles fue el 4 de noviembre de 2002.

## **3. Levantamiento de cuarentena**

Una vez que los resultados de la centinelización de las aves susceptibles concluyeron la ausencia de actividad viral en los dos planteles afectados por la IA (Miltil y Tremolén), el 15 de diciembre de 2002 se levantó la cuarentena así como las restricciones de movimiento que los afectaban.

## Anexo1

### Cronograma de sanitización y verificación de ausencia de actividad viral en sectores infectados, año 2002

MILTIL NORTE SEMANAS	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
SACRIFICIO DE LAS ULTIMAS AVES																												
COMPOSTAJE																												
ENTIERRO ULTIMO GUANO																												
LAVADO																												
DESINFECCION																												
PERIODO DE SILENCIO																												
CENTINELIZACION																												
LEVANTAMIENTO DE CUARENTENA																												

MILTIL SUR SEMANAS	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
SACRIFICIO DE LAS ULTIMAS AVES																												
COMPOSTAJE																												
ENTIERRO ULTIMO GUANO																												
LAVADO																												
DESINFECCION																												
PERIODO DE SILENCIO																												
CENTINELIZACION																												
LEVANTAMIENTO DE CUARENTENA																												

TREMOLÉN SEMANAS	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
SACRIFICIO DE LAS ULTIMAS AVES																												
COMPOSTAJE																												
ENTIERRO ULTIMO GUANO																												
LAVADO																												
DESINFECCION																												
PERIODO DE SILENCIO																												
CENTINELIZACION																												
LEVANTAMIENTO DE CUARENTENA																												

## Anexo 2

### Procedimiento de limpieza y desinfección de galpones positivos a IA

#### 1. Desinsectación – reposo galpón y lavado inicial

1.1. Aplicar insecticida de acción inmediata (efecto knock down).

Máquina turbo con 800 litros de agua, en dosis de 5 litros de K-Obiol F<sup>R</sup> por sector (suficiente para 2 galpones); ingrediente activo: Deltametrina<sup>R</sup> 6,5 gr/l, Fenitrotión<sup>R</sup> 250 gr/l -Piretroide + Órgano Fosforado-. Dejar actuar por 24 horas con cortinas y portones cerrados.

1.2. Cerrar el galpón en forma segura por 7 días.

1.3. Raspado de esterillas, desarme de cortadas y tolvas de alimento.

1.4. Lavar con máquina turbo llena con 2.000 litros agua y 0,5 litros de Prodeter Glass<sup>R</sup> (detergente líquido altamente concentrado):

- estructuras internas
- ponederos externamente
- slats
- canoas
- bebederos externos
- cortinas y parciales fijos
- tolvas, cortadas, techos del Vencomatic<sup>R</sup> (parte superior).

**Recomendaciones:** del galpón no deben salir implementos sucios. Si fue poca la solución, preparar nueva solución de igual manera.

#### 2. Desarme del galpón

- Levantar la totalidad de los slats y amarrarlos con alambre.
- Sacar la totalidad de los techos de los Vencomatic<sup>R</sup>, dejarlos en el interior del galpón.
- Sacar los nylon interiores y quemarlos.

#### 3. Sacar restos de alimentos de silos

Sacar restos de alimentos de los silos y vaciarlos al guano dentro del galpón, lavar posteriormente los silos con detergente y desinfectar de la misma forma que los galpones.

#### 4. Desinfección general interior

Desinfección inicial del galpón con Ucarsan<sup>R</sup> (ingrediente activo: Glutaraldehído/Amonio Cuaternario) o Glutaraldehído 20%<sup>R</sup>: 4 litros por cada 800 litros de agua por galpón. Esperar 12 horas y luego puede entrar el personal a trabajar.

#### 5. Cocer el guano positivo

Vaciar alimento de canoas, comederos y silos al guano directamente, humedecer la mezcla regando (alcanzar humedad de 45-60%), hacer las bardas (camellones). Tapar con plástico, sellar de la manera establecida. La temperatura deberá subir lo más cercana a 40 °C, mantener compostado por 15 días.



#### 6. Cal viva a las bardas de guano

Luego de 15 días de cocción del guano, y si la pila no alcanza la temperatura de término, dejar 7 días más en compostaje; terminado ese ciclo, y si la pila de guano compostado en la superficie alcanza 15 °C como máximo, entonces:

- agregue cal viva sobre la pila a razón de 20 kilos por metro lineal (3%); observe que se active, si ello no ocurre, humedezca lo suficiente para que reaccione. Esta aplicación se realizará a todas las bardas de guano independiente de la temperatura de su superficie.

#### 7. Lavado de esterillas y nidos

A los 15 días de cocerse el guano, proceder a lavar las esterillas y los nidos con máquina turbo llena con 2.000 litros agua y 0,5 litros de Prodeter Glass<sup>R</sup> (detergente líquido altamente concentrado). Una vez que se termine de lavar los nidos sacar los techos y los pads dejándolos apilados en la parte posterior del galpón.

## **8. Desinfección de esterillas y nidos**

Desinfectar esterillas y nidos con Creolina: 50 litros para 2.000 litros de agua por sector, es decir, 1.000 litros por galpón.

## **9. Primera aplicación de cal viva**

Aplicar cal viva al interior y perímetros del galpón, con el fin de desactivar el guano que viene del lavado de esterillas y nidos.

## **10. Barrido interior y exterior de galpones**

Se procederá a barrer el interior y exterior de los galpones, acumulando todo el barrido en las bardas de guano.

## **11. Saca de guano de los galpones**

Se procede a cargar los camiones con guano y 3% de cal viva que irán sellados con plástico. Todo el guano debe vaciarse en lugar único en el mismo establecimiento, aislado y cercado. Se debe tapar con tierra y cal y el plástico debe quemarse. Los cuidados deben ser extremos, a objeto de no contaminar caminos o áreas limpias. Las áreas de depósito del guano corresponderán a una quebrada, transitando por “camino sucio”.

Una vez cargado el camión con guano, y antes de salir del sector en dirección a la guanera, éste deberá ser desinfectado con yodo (1 litro por cada 100 litros de agua). Una vez descargado el guano en la guanera y antes de dirigirse nuevamente al sector, el camión, deberá ser nuevamente desinfectado con yodo en la misma concentración señalada anteriormente. Al término del día, los caminos utilizados para sacar el guano se desinfectarán con creolina utilizando para tal efecto una bomba turbo.

El chofer del camión debe desinfectar la cabina y usar ropa adecuada de tránsito pre y post carguío del guano.

## **12. Repaso del barrido**

Una vez terminado de sacar el guano, realizar un repaso del barrido; todo material que se junte deberá ser enviado a la guanera en sacos cerrados, los que deben ser eliminados o desinfectados efectivamente.

## **13. Lavado final: interior y exterior del galpón**

Lavado con detergente (en lo posible con agua caliente), con máquina turbo llena con proporción de 2.000 litros de agua más 0,5 litros de Prodeter<sup>R</sup>, de:

- estructura interna
- lavado de ponederos

- lavado de slats
- lavado de canoas
- lavado de bebederos externo e internamente con 2 litros de DELIMER<sup>R</sup>, dejar reposar por 2 días y luego despichar
- lavado de pieza de huevos
- lavado de silos y romanas
- lavado de tolvas, cortadas, techos y pads del Vencomatic<sup>R</sup>
- lavado de estructuras exteriores (vigas, antepechos, cortinas, etc.)

#### **14. Barrido galpón, sólo interior**

Desinfectar escobas y escobillones o cualquier implemento de barrido, antes y después de su utilización.

#### **15. Segunda aplicación de cal viva**

Aplicar al interior del galpón de tal manera que cubra toda la superficie, vigilar que se active.

#### **16. Desinfección interior**

Con Ucarsan<sup>R</sup> o Glutaraldehído 20%<sup>R</sup>, con 4 litros por cada 800 litros de agua por galpón interior, en igual orden que el lavado.

#### **17. Insecticida residual**

Piretroide Cyperkill<sup>R</sup>, 500 cm<sup>3</sup> por galpón con termoniebla (cañón) o en 300 litros con nebulizador.

#### **18. Armado de nuevo galpón**

Poner cama nueva y desinfectar interiormente, ideal sistema cañón termoniebla con Ucarsan<sup>R</sup> o Glutaraldehído<sup>R</sup> en dosis de 1 litro en solución de 50 litros de agua (ojalá estanque adecuado para este fin), ó 4 litros en 800 de agua, igual a desinfecciones anteriores. Cerrar el galpón.

#### **19. Aplicar estricto control de roedores**

Evitar el paso de personas de un galpón a otro; realizarlo con personal interno de granja.

#### **20. Repaso de desinfecciones**

Una vez finalizado, hay que repasar desinfecciones en áreas posibles de recontaminación. Luego, el galpón queda cerrado por 2 semanas hasta definir período para instalar aves centinelas.

## 21. Bioseguridad personal

- El personal que trabaja en el aseo y desinfección se debe trasladar desde sus casas al establecimiento en un bus exclusivo para el personal de reproductoras.
- En el establecimiento proceden a cambiar su ropa por una de tránsito.
- La ropa es fumigada a las 9:00 y 19:00 h.
- En el sector de trabajo se cambian nuevamente de ropa (ropa de tránsito por una especial de trabajo: buzo, faja lumbar, botas, mascarilla, guantes, cascos, etc.).
- Finalizado el trabajo, al salir del sector, deben ducharse.
- Vuelven a sus casas en un mismo bus y con sus ropas fumigadas.

## 22. Bioseguridad granja

- Prohibido ingreso de visitas. Sólo ingresa personal que trabaja exclusivamente en el establecimiento. En portería son identificados y controlados.
- Sólo pueden ingresar las camionetas de la empresa y ocasionalmente camiones que abastecen de petróleo a algunas máquinas. Todo vehículo es desinfectado a la salida del establecimiento con solución yodada.
- Pediluvios a la entrada del establecimiento y de oficinas.
- Se fumiga diariamente con formalina las oficinas, baños, lavandería, vestidores.



# Laboratorio de diagnóstico

## 1. Introducción

La capacidad demostrada por el [Laboratorio Pecuario](#) Central del SAG, en la erradicación de enfermedades y en situaciones emergenciales, fue puesta a prueba nuevamente durante la emergencia de influenza aviar del año 2002, en orden a analizar y procesar grandes volúmenes de muestras con resultados trazables y en condiciones de bioseguridad acordes a las exigencias.

La experiencia previa del laboratorio favoreció, sin lugar a dudas, la puesta en funcionamiento de la estructura, durante este evento. En efecto, el programa Planteles Avícolas Bajo Certificación Oficial (PABCO) y la certificación de exportaciones avícolas con destino a México, habían proporcionado al laboratorio experiencia en el diagnóstico de IA, el que estuvo a cargo de la Unidad de Virología Pecuaria del Laboratorio Oficial del SAG, al menos con dos de las principales técnicas recomendadas: Inmunodifusión en Gel de Agarosa (IDAG) en su vertiente serológica y aislamiento viral, mediante la inoculación en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF). Aún cuando nunca antes se había detectado el virus en aves nativas, ya se habían establecido los protocolos de trabajo, así como los biológicos y materiales en cantidades necesarias para la demanda y la capacidad potencial referida.

En ese momento se poseía la capacidad de analizar gran cantidad de muestras; las únicas limitantes eran el abastecimiento de antígenos y de huevos SPF en forma oportuna, regular y suficiente, aunque no se afectó el diagnóstico normal de rutina, ya que se contó con recursos técnicos y humanos para la emergencia.



Las muestras para el diagnóstico serológico de IA, se destinaron a las dependencias de mayor dimensión de la Unidad de Virología Pecuaria, habilitadas para uso exclusivo del diagnóstico mediante IDAG; el procedimiento se realizó en un en serie, desde el ordenamiento y clasificación de las muestras, hasta la obtención de resultados. Los suministros se ingresaban a diario y se incineraban todos los materiales utilizados y las muestras con resultados negativos. Los sueros de las muestras positivas fueron manipulados en gabinetes de bioseguridad y centrifugados y conservados en congelación, hasta su posterior análisis mediante las técnicas

Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) y ELISA; además, éstos se enviaban a los laboratorios de referencia (Ames y Weybridge).

Las muestras para el diagnóstico virológico fueron derivadas a dependencias adyacentes, en la Unidad de Virología Pecuaria, para la preparación de los correspondientes inóculos en gabinetes de bioseguridad. Con excepción de las pruebas de patogenicidad en pollos (que se desarrollaron en aisladores ubicados en el adyacente Laboratorio de Control de Productos Biológicos), la inoculación en huevos embrionados SPF, las pruebas de PCR y las pruebas ELISA, se desarrollaron íntegramente en la Unidad de Virología Pecuaria, evitando así las contaminaciones cruzadas.

## **2. Antecedentes relativos a las denuncias de mortalidad en aves**

El viernes 24 de mayo de 2002, un epidemiólogo y un patólogo del SAG visitaron un plantel de aves reproductoras ubicado en la V Región, Comuna de San Antonio. La visita se originó en una denuncia de aumento de mortalidad en aves reproductoras broiler, sospechándose de un cuadro tóxico. Los datos preliminares señalaban en las tablas de mortalidad diaria un aumento creciente a partir del 17 de mayo; los días 13 y 14 se había administrado un alimento medicado.

Durante la visita se seleccionaron pabellones con diferentes tasas de mortalidad, de los cuales se obtuvo un total de 40 aves para las necropsias. Se decidió que los procedimientos de necropsia y obtención de muestras se realizaran en un lugar alejado de los pabellones, acondicionado especialmente para tales efectos.

Las lesiones macroscópicas observadas fueron de intensidad leve a moderadas y compatibles con un cuadro de IA, presuntamente de alta patogenicidad. Se obtuvieron muestras de sangre y tejidos (tráquea, pulmón y bazo) para exámenes virológicos, serológicos y cultivos, a fin de obtener un diagnóstico definitivo y confirmatorio.

De inmediato se comunicó el hallazgo preliminar, y se instruyó en el laboratorio el procesamiento de las muestras de sangre obtenidas en terreno, a fin de obtener un resultado serológico dentro de 24 horas. Al día siguiente, se obtuvo resultados positivos a IA mediante prueba de ELISA y a las 48 horas se confirmó a través de la prueba IDAG.

Los antecedentes que hicieron sospechar de IA, fueron las mortalidades diarias crecientes, la escasa signología clínica y las siguientes lesiones macroscópicas: cianosis de cresta y barbillas, congestión de la musculatura pectoral, hemorragias en la superficie serosa del estómago muscular, hemorragia en la parte interna de la quilla, petequias del mesenterio, hemorragias en grasa de pericardio y aurículas, hemorragias petequiales y equimóticas del proventrículo, salpingoperitonitis y hemorragias lineales diseminadas en páncreas.

Las necropsias de fechas posteriores (27 de mayo, 4 y 5 de junio), mostraron lesiones macroscópicas similares, con un mayor grado de intensidad, y se detectó, además, edema de las barbillas, subcutáneo del cuello y de extremidades inferiores y hemorragias en piel.

### 3. Técnicas utilizadas

#### 3.1 Diagnóstico virológico

##### Aislamiento de virus en huevos embrionados SPF

Previo al brote de IA del año 2002, la Unidad de Virología Pecuaria tenía una vasta experiencia en el uso de la técnica de inoculación en huevos embrionados SPF (HE-SPF). Los huevos eran adquiridos en la Universidad Austral de Chile, que poseía un plantel de pollos SPF, que era supervisado bianualmente por funcionarios de la Unidad de Virología Pecuaria del SAG, para certificar su calidad de SPF. La técnica de inoculación se aplicaba de acuerdo a los procedimientos recomendados por la normativa de la OIE.

Durante el brote de IA del año 2002, y para evitar contaminaciones cruzadas, se decidió en conjunto con asesores extranjeros, utilizar sólo muestras obtenidas con tómulas cloacales o traqueales. También se estableció, para evitar contaminaciones, que después de un tiempo de permanencia en el tubo con medio, las tómulas fueran retiradas del tubo con el medio de transporte (caldo de crecimiento cerebro-corazón adicionado de antibióticos y antifúngicos) y sólo se remitiera éste al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas de acuerdo al manual de la OIE e inoculadas en 5 huevos por muestra (por tubo). Se inocularon 0,2 ml por huevo. Cuando las muestras provenían de tómulas, se realizaban dos pasajes en huevos, a diferencia de las muestras que provenían de órganos, a las que se les realizaba sólo un pasaje, ya que contienen una mayor cantidad de carga viral. Respecto de estas últimas, en el laboratorio se aceptaban sólo en el caso de evidencias clínicas de enfermedad. Todo este procedimiento fue realizado en cámaras de flujo laminar.

Se programaron importaciones de huevos SPF, debido al aumento en la demanda de éstos, a fin de agilizar la inoculación.



Los líquidos corio-alantoideos positivos a la aglutinación fueron sembrados en placas de agar sangre, para eliminar la eventual presencia de contaminación bacteriana; luego se les realizaba

la prueba de tipificación Directigen Flu (próximo punto). En caso de positividad se realizaban pruebas confirmatorias para IA con técnicas de sub-tipificación, como la Inhibición de la Hemoaglutinación, la Inhibición de la Neuroaminidasa y la RRT-PCR.

Los aislados realizados de las muestras del brote fueron remitidos también, a los laboratorios SERPL en Athens, Atlanta, y al NVSL-DVL en Ames, Iowa, ambos del USDA, Estados Unidos, y al Central Veterinary Laboratories (CVL), en Weybridge, Inglaterra, para su posterior secuenciación.

### **Técnica de tipificación Directigen Flu**

Esta técnica, implementada a principio del brote, consistía en un kit comercial de un ensayo inmunoenzimático en membrana, para una detección rápida, directa y cualitativa del virus influenza tipo A; se utilizaban muestras de tórulas traqueales de animales con sintomatología. También se utilizó a partir de líquidos alantoídeos sospechosos de contener virus. El tiempo total de la prueba es de menos de 15 minutos, con una reactividad determinada en una reacción visual de color (se desarrolla un triángulo púrpura en la membrana lo que indica que el resultado es positivo).

Todos los aislados reaccionaron positivamente con esta técnica, lo que fue de gran utilidad práctica para analizar muestras que ingresaban con carácter de urgencia.



### **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RRT-PCR), con Transcripción Reversa**

Históricamente, los virus IA de alta patogenicidad en la avicultura han pertenecido a los subtipos H5 y H7 de las hemoaglutininas (HA); en el caso del brote en Chile correspondió al subtipo H7. Por ello, era prioritario identificarlo específicamente mediante técnicas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con Trascricpción Reversa (RRT-PCR).

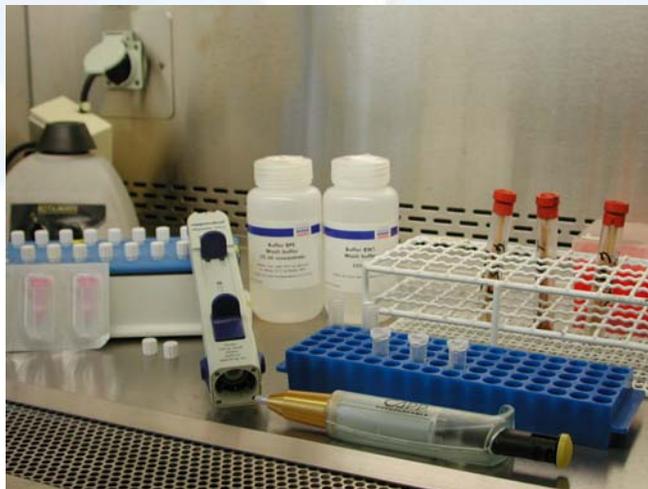
Esta técnica permitió identificar y confirmar que los aislados virales circulantes correspondían a influenza tipo A, subtipo H7; además identificó el subtipo H5 en un lote de vacuna de HCl contaminada con RNA de virus influenza.

La RRT-PCR fue desarrollada por el equipo de investigadores del Southeast Poultry Research Laboratory (SEPRL-USDA-Agricultural Research Service-ARS) y del National Veterinary Service Laboratory (NVSL-USDA-APHIS) quienes, además, la transfirieron y entregaron la respectiva capacitación, al equipo de profesionales del Laboratorio de Virología Pecuaria del SAG, a fin de implementarla en Chile. Así se estableció una cooperación activa para el desarrollo de la RRT-PCR y para realizar estudios moleculares como la identificación, caracterización molecular, análisis de la secuencia y filogenia de los aislados chilenos del virus IA subtipo H7N3, responsable del brote en el país.

La PCR convencional ha sido descrita como una de las técnicas más específicas para la tipificación y subtipificación de los virus influenza y, adicionalmente, se ha mejorado y simplificado a través de un RRT-PCR en un solo paso, el que es un ensayo rápido ya que los resultados, incluyendo la subtipificación por hemoaglutinina, están disponibles en menos de un día; además, no requiere partículas virales infectantes, minimiza la manipulación y, por lo tanto, la contaminación cruzada. Por lo anterior, esta técnica implementada y utilizada como diagnóstico de rutina representa una herramienta útil de laboratorio para apoyar los programas de vigilancia, pues permite detectar oportunamente los subtipos de alto riesgo (H5 ó H7) circulantes en las aves silvestres y/o de producción, los que se caracterizan por su capacidad de traslocarse, desde un virus de baja patogenicidad a uno altamente patógeno.

### Principio de la técnica

El principio general de la RRT-PCR es el mismo que el de la PCR convencional; sin embargo, si el producto de la reacción es positivo, es monitoreado en tiempo real mediante una sonda fluorogénica. Ésta se une al fragmento amplificado y emite fluorescencia al ser liberada por acción exonucleasa de la enzima Taq-Polimerasa en cada ciclo de amplificación y polimerización; la intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto formado.



Para la PCR convencional se utiliza el kit RNeasy de Qiagen; se realiza la extracción de RNA desde muestras de tórculas cloacales y/o traqueales, obtenidas de las aves sospechosas.

Para la RRT-PCR se utiliza el kit One Step de Qiagen que incluye, en un solo tubo, una mezcla de reacción con las actividades de la enzima Transcriptasa Reversa y Taq-Polimerasa, más los partidores y la sonda fluorogénica diseñadas específicamente para el RRT-PCR de IA; en el caso de la IA tipo A son partidores para el gen Matrix, y para la subtipificación son oligos para la hemoaglutinina H5, H9 y H7. En el caso del H7 se desarrollaron partidores específicos con la secuencia de hemoaglutinina de los aislados chilenos.

La reacción del RRT-PCR se desarrolla en un equipo especial (Smart Cycler), junto con el análisis e interpretación de resultados con el software incluido en el sistema, mediante el cual los resultados pueden ser graficados o analizados en tablas.

### **Ventajas y aplicaciones**

- rapidez del ensayo (sólo toma 1-2 horas);
- alta sensibilidad y especificidad;
- mayor bioseguridad, el análisis se realiza sobre el material genómico (RNA) de la muestra desnaturalizada;
- posibilidad de analizar cuantitativamente la carga viral.

Las aplicaciones de esta técnica están orientadas principalmente para ser empleadas en forma de "screening", es decir, deben utilizarse como un modo rápido de obtener información de calidad preliminar. Esta característica hace que la técnica sea de mayor utilidad práctica que los métodos oficiales en caso de una emergencia, donde se requiere tomar decisiones.

### **Resultados**

De esta manera, como parte de los esfuerzos del "Programa de Control y Erradicación de la IA", se implementó y utilizó la RRT-PCR con sondas del tipo hidrólisis fluorogénicas (Taqman), para un screening rápido del virus de la influenza tipo A y la subsecuente identificación de los subtipos H5, H7 y H9, en muestras clínicas y en aves de los planteles.

De esta manera se identificó y confirmó que los aislados virales correspondían a influenza tipo A, del subtipo H7. Además, se identificó el subtipo H5 en un lote de vacuna de HCI, contaminada con RNA de virus influenza, la cual había sido aplicada en planteles nacionales; ésta es la responsable de la serología H5 detectada. Con la prueba de influenza tipo A, se usaron los partidores dirigidos al gen Matrix, como se describió previamente.

Se usaron dos series de partidores y sondas para confirmar el subtipo viral como H7; la primera serie de partidores/sonda fue la descrita por Spackman *et al.*(2002)<sup>2</sup>, sin embargo, la prueba específica para el subtipo H7 no logró amplificar el virus chileno, por lo que se tuvo que diseñar una nueva serie de partidores y sonda dirigidos a la línea H7 norteamericana, como también a la línea chilena, a fin de identificarlos.

Además, se realizó la caracterización de los aislados obtenidos en Chile, con particular referencia a los virus de influenza aviar altamente patógena (IAAP), los que, a pesar de poseer

---

<sup>2</sup> Spackman, E., D.A. Senne, T.J. Myers, L.L. Bulaga, L.P. Garber, M.L. Perdue, K. Lohman, L.T. Daum & D.L. Suarez. 2002. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. [J.Clin. Microbiol. 40:3256-3260.](#)

un inserto de 10 aminoácidos en el sitio de clivaje HAO, no conforma el dogma de que el motivo -R -X -R/ K -R\* G -L -F- es el prerequisite para los virus IAAP. Además, se presentó la evidencia que el inserto de 10 aminoácidos presentes en los virus IAAP, sería el resultado de una recombinación entre los genes de la hemoaglutinina y la nucleoproteína.

### 3.2 Técnicas serológicas

#### Inmunodifusión en Agarosa (IDAG) y Elisa

Las dos técnicas serológicas empleadas en el brote correspondieron a la prueba de IDAG (oficial de acuerdo a la OIE) y a la prueba ELISA, con kit comercial, que se usó sólo en casos excepcionales.

La primera de ellas, utilizada en forma masiva durante el brote y para todos los monitoreos posteriores, corresponde a una Inmunodifusión en Gel de Agarosa, que utiliza antígenos y anti-sueros importados desde el laboratorio de referencia DVL, NVSL, APHIS, del USDA. Esta técnica detecta anticuerpos contra antígenos grupo-específicos tipo A para virus influenza.

Esta prueba también se utilizó para confirmar el virus aislado, moliendo las membranas corio-alantoídeas de los huevos y contraponiendo el suero control positivo que utiliza la técnica.

Durante la emergencia, esta prueba se realizó en las dependencias de mayor dimensión de la Unidad de Virología Pecuaria, la que se sectorizó de acuerdo a las distintas etapas de la técnica (preparación de placas, identificación y registro de muestras y sembrado). Las lecturas de los resultados se realizaban a las 24 horas de sembradas; las placas se incubaban a 37 °C.

Todos los resultados positivos se repitieron para confirmar su positividad. Estos sueros fueron enviados a laboratorios de referencia para su posterior sub-tipificación. Luego, esta sub-tipificación fue montada en el laboratorio del SAG, por asesores internacionales del DVL, NVSL (USDA).



## **Subtipificación de sueros y virus mediante pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación e Inhibición de la Neuroaminidasa**

Estas técnicas fueron implementadas en el Laboratorio Oficial del SAG, con la asesoría de los laboratorios DVL-NVSL-APHIS, del USDA. Se trajeron los reactivos y biológicos necesarios para el montaje de la sub-tipificación de las hemoaglutininas H5, H7 y H9 y Neuroaminidasas N2 y N3. También se recibieron aportes del laboratorio de referencia de la OIE de Italia.

Estas técnicas son aplicables para subtipificar sueros y aislados de virus influenza. Los requisitos que debe cumplir el suero para proceder a la subtipificación son: hemólisis ausente, libre de contaminación bacteriana, en un volumen mínimo de 600 µl y fuertemente positivo a la reacción serológica. Por otra parte, para la sub-tipificación de un aislado se utiliza el líquido alantoideo centrifugado y tipificado previamente por PCR o por la técnica de Directigen Flu.

Todos los sueros y aislados del brote correspondieron a H7N3, a excepción de los sueros provenientes de un plantel que había aplicado vacuna HCl contaminada con virus influenza inactivado, los que fueron sub-tipificados como H5N2.

### **3.3 Estudios de patogenicidad**

#### **Prueba de inoculación endovenosa en pollos de 4 a 8 semanas de edad**

El Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE<sup>3</sup>, establece el procedimiento de inoculación endovenosa en pollos, como parte del estudio de patogenicidad de la cepa viral aislada. Cada cepa recibida del laboratorio privado que la aisló, incluyendo la que resultó ser de baja patogenicidad, fue diluida 1:10 en PBS estéril, adicionado con antibióticos; se inocularon, en volumen de 0,2 ml vía endovenosa, en pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad.

Todas las cepas aisladas durante el brote provocaron la mortalidad de la totalidad de los pollos durante el período de observación correspondiente, lo cual otorgó la clasificación de cepas altamente patógenas. Por definición, éstas deben provocar no menos del 75% de mortalidad en 8 días de observación. La cepa de baja patogenicidad aislada del plantel por el laboratorio privado, antes de la aparición de la sintomatología típica en las aves, fue la única que no provocó mortalidad en los pollos inoculados.

La nueva definición denominada Índice de Patogenicidad Intravenosa (IVPI), correspondía a 0 (baja patogenicidad) para la cepa de baja patogenicidad, es decir, los pollos inoculados no mostraron signos, síntomas ni mortalidad dentro del período de observación, y de 3 (altamente patogénica) para las cepas de alta patogenicidad, lo cual indica que todos los pollos murieron a las 24 horas de inoculados.

#### **Inoculación en cultivos celulares**

La OIE sugiere inocular las cepas en cultivos celulares para evaluar patogenicidad; especialmente se refiere a cepas H5 ó H7 de baja patogenicidad o a otras cepas de virus IA. En este caso, las cepas fueron inoculadas en fibroblastos de pollo, en ausencia de tripsina,

---

<sup>3</sup> [http://www.oie.int/esp/publicat/es\\_standards.htm](http://www.oie.int/esp/publicat/es_standards.htm)

provocando un efecto citopático específico (E.C.E.), catalogándolas también como cepas de alta patogenicidad. La cepa de baja patogenicidad no provocó E.C.E.

#### **Estudio del sitio de clivaje**

Las cepas virales fueron enviadas a tres laboratorios de referencia: dos en Estados Unidos (DVL-NVSL y SERPL) y uno en Inglaterra (CVL), para la secuenciación del sitio de clivaje, que es el último criterio que propone la OIE para clasificar cepas de IA como altamente patogénicas.

La patogenicidad está asociada con la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la hemoaglutinina. La cepa de baja patogenicidad tuvo la siguiente secuencia aminoacídica: PEKPKTR/GLF; las demás cepas (de alta patogenicidad), se agruparon en dos tipos, que sólo difieren en un aminoácido: PEKPKTCSPLSRCRKTR/GLF y PEKPKTCSPLSRCRETR/GLF. Estas secuencias aminoacídicas son inusuales y no concuerdan con los aminoácidos básicos múltiples característicos de otros virus de alta patogenicidad. Este encuentro tiene un impacto significativo en la definición molecular usada para identificar virus de IA altamente patogénicos.

#### **4. Seguridad biológica en laboratorios**

Las medidas de bioseguridad contempladas para el ingreso a los laboratorios de Virología Pecuaria, así como de Patología, se regían por las siguientes normas:

- cambio completo de vestuario;
- prohibición del ingreso de efectos personales;
- ingreso de alimentos en pocillos desechables.

En la Unidad de Virología Pecuaria, las muestras eran recibidas a través de una doble ventanilla de ingreso, lo mismo que algunos medios y reactivos. Este laboratorio cuenta con presión de aire negativa, filtros HEPA, cámaras de flujo laminar, tratamiento de aguas, incineración, autoclavado y desinfección (gas formaldehído). Se utilizó material desechable como pipetas, placas, puntas y guantes, entre otros, el cual, una vez utilizado, era incinerado previo autoclavado. Todo el material como papeles, documentos, protocolos o cualquier objeto que tuviera que salir de la unidad, era sometido a desinfección con gas formaldehído.

Una vez finalizado el trabajo diario, el personal debía dejar todo su uniforme en un recipiente ad-hoc para su posterior autoclavado y envío a lavado. Se exigía para todo el personal, una ducha de tres minutos como mínimo, con lavado del cabello.

Estas mismas medidas de bioseguridad se contemplaron para las pruebas de inoculación en pollitos, las cuales se realizaban en salas adecuadas para este fin que incluían aisladores para aves (Laboratorio de Control de Productos Biológicos).