

Publicación de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

REDACTOR RESPONSABLE
Prof. Dr. Walter García Vidal, DMV
MSc. Academia Nacional de Veterinaria

CONSEJO EDITOR
Aldrovandi, Ariel; DMTV
Facultad de Veterinaria
Colombo, Alicia; DMTV;
Facultad de Veterinaria
Kremer, Roberto; DV; MSc.
Facultad de Veterinaria
Maisonnave, Jacqueline; DV; PhD.
Facultad de Veterinaria
Perez C., Raquel; DV; MSc
Facultad de Agronomía
Puignau, Juan P. DMV;
IICA - Uruguay
Rimbaud, Enrique; DMTV;
Ejercicio Independiente
Saizar, Julia; DMV;
DILAVE "Miguel C. Rubino"
Solari, María A.; DV;
DILAVE "Miguel C. Rubino"

ASESOR
Bibliotecóloga Elba Dominguez,
Técnico de Hemeroteca, Dpto. Doc. y
Biblioteca, Facultad de Veterinaria,
Montevideo - Uruguay.

EDITOR
Walter Roel
Ediciones Maya
Joaquín de Salterain 1520 - Tel. 417596

PUBLICIDAD
Luis Roel
Tel. 63 16 64

COMPOSICION ARMADO Y
DIAGRAMACION
Ana M. Cópola

IMPRESION
Tall. Graficos Vanguardia S.A.
Dep. Legal 8268/93

Contenido

EDITORIAL

V Congreso de Medicina Veterinaria
Mensaje del Presidente, Dr. Juan José Mari

3

COMUNICACION CIENTIFICA

Babesiosis-Anaplasmosis en el área de acción del
Laboratorio Regional Noroeste Paysandú. Período
1980-1990

Quintana, S., Liuzzi, B., Fabregas, B.

5

REVISION

Amplificación de ADN in vitro (PCR):
instrumentación y metodología básica

Hirigoyen, D., Bruzzoni Giovanelli, H., Azambuja, C., Stoll, M.

13

DE INTERES

Carnicerías: competencias legales de los
aspectos higiénicos

Pérez Sánchez, R., Casaux, G.

20

Esta edición consta de 2.500 ejemplares y se distribuye sin costo a todos los socios de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. Por suscripciones: ANTEL : 62.08.73c/u N\$ 10.000, anual (4) N\$ 32.000. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente.

Esta publicación no se responsabiliza por los conceptos vertidos por los autores. Se autoriza la reproducción total o parcial de los resúmenes editados mencionando la fuente.

Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria (convenio SMVU/Fac. Vet. 16/12/1988).

FOTO CARATULA:

CASA DEL VETERINARIO
CERRO LARGO 1895

COMITE DE ARBITROS DE TRABAJOS CIENTIFICOS 1989 - 1992

ALVES P., C.	(DMV)	BRASIL	MARTIN E.	(DMV)	ARGENTINA
AZZARINI, M.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	NARI, A.	(DMV)	URUGUAY
BOSCH, R.	(DMV)	ARGENTINA	NIETO, A.	(DQ)	URUGUAY
CAPANO, F.	(DMV)	URUGUAY	PERDOMO, E.	(DMV)	URUGUAY
CARBALLO, M.	(DMV)	URUGUAY	PEREZ CLARIGET, R.	(DMV)	URUGUAY
CARDOZO, H.	(DMV)	URUGUAY	QUIÑONES S., C.	(DMV)	URUGUAY
CAVESTANY, D.	(DMV)	URUGUAY	QUIÑONES, J.	(DMV)	ARGENTINA
CORENGIA, C.	(PROF)	URUGUAY	RIET CORREA, F.	(DMV)	BRASIL
da SILVEIRA OSORIO, J.C.	(DMV)	BRASIL	RODRIGUEZ, M. I.	(DMV)	ARGENTINA
DURAN DEL CAMPO, A.	(DMV)	URUGUAY	SCARSI, R.	(DMV)	URUGUAY
FERNANDEZ, D.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	RODRIGUEZ H.	(DMV)	SUECIA
FORCHETTI, O.	(DMV)	ARGENTINA	TOLOSA, J. S.	(DMV)	ARGENTINA
GUARINO, H.	(DV)	URUGUAY	TORTORA, J.	(DMV)	MEXICO
HOLENWNGER, J.	(DMV)	URUGUAY	VAZQUEZ, M.	(DMV)	ARGENTINA
LOPEZ PEREZ, A.	(DV)	URUGUAY	VIDOR, T.	(DMV)	BRASIL
			YARZABAL, L.	(DM)	URUGUAY

SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

CONSEJO DIRECTIVO

PRESIDENTE:

Dr. Juan José Mari

PRESIDENTE SUPLENTE:

Dr. Alberto Sanner

VICE-PRESIDENTE:

Dr. Francisco Muzio

SECRETARIO:

Dr. Walter Faliveni

PRO SECRETARIO:

Dr. Ignacio Pereira

TESORERO:

Dra. Adriana Rodríguez

PRO TESORERO:

Dr. Luis Delucchi

VOCAL:

Dra. Virginia Diana

ASOCIACIONES ESPECIALIZADAS
QUE INTEGRAN LA S.M.V.U.

-COMISION DE REPRODUCCION
E INSEMINACION ARTIFICIAL

-SOCIEDAD DE BUJATRIA DEL URUGUAY

-COMISION DE INDUSTRIA
PESQUERA Y ACUICULTURA

-ASOCIACION DE VETERINARIOS
EN EL AREA DE LA CARNE

-COVET -OESTE

CENTROS VETERINARIOS AGRUPADOS EN LA SOCIEDAD

ARTIGAS

Dra Marianela Acevedo

L. A. de Herrera 380

TOMAS GOMENSORO

Dr. Nelton Barreda

25 de Agosto s/n

PANDO

Dr. Eduardo Bianchi

25 de Mayo 1017

CERRO LARGO

Dr. Hugo Arambillete

A.Saravia 437 -Melo

COLONIA

Dr. Guillermo Piferer

Límite Oeste 1818

Tarariras

DURAZNO

Dra. María Pérez Bene

Leandro Gómez 635

FLORES

Dr. Hugo Rusiñol

Batlle y Ordóñez 893 Trinidad

FLORIDA

Dr. Roberto Acuña

J.I.Cardozo 658

LAVALLEJA

Dr. Gonzalo Curotto

Veterinaria "La Mariscala" -Mariscala

MALDONADO

Dr. Luis García

25 de Mayo 892

PAYSANDU

Dr. Recaredo Ugarte

Uruguay 1189

RIO NEGRO

Dr. Alberto Bofill

Zeballos 3364 -Young

RIVERA

Dr. Rafael Piazze

Agraciada 558 ap. 2

ROCHA

Dr. José Martínez

Julián Graña 124

SALTO

Dr. Julio Hirigoyen

Amorín 55

SAN JOSE

Dr. Jorge Marra

18 de Julio 589

SORIANO

Dr. Fernando López

Sesafín Rivas 730

TACUAREMBO

Dr. Antonio Albermaz

Pablo Ríos 420 bis

PASO DE LOS TOROS

Dr. José Baptista

18 de Julio 431

TREINTA Y TRES

Dr. Luis Tarán

Rincón 203

CHUY

Dr. Julio Correa Rocha

Artigas 360

V Congreso de Medicina Veterinaria Mensaje del Presidente, Dr. Juan José Mari

El Congreso de Medicina Veterinaria tuvo a lo largo de sus días de realización el brillo científico y el clima social que pretendieron sus organizadores. Como es tradicional, el comité organizador cuenta con una gran libertad en la elección del temario y en la elección de los paneles y disertantes. Como es tradicional estos estuvieron a la altura de las circunstancias y la profesión pudo discutir los temas más importantes del momento.

La elección de los paneles con el telón de fondo del Mercosur es la evidencia concreta de la inquietud que tiene la SMVU con respecto a las repercusiones que pueda tener la vigencia plena de este mercado común, para el cual los gobernantes con tino o sin él, simplemente marcaron como un marco para el cual nosotros los ciudadanos debemos dar el contenido.

Empezando por la profesión y el Mercosur, debemos rescatar que el panel reconoció que las cinco preguntas que planteaba la SMVU debían ser la base de encuentro de los profesionales. Esas preguntas hacen a la necesidad de reválida de los títulos, máxime cuando tenemos dos países como Argentina que tiene 8 Facultades de Veterinaria y Brasil 35, de las cuales 9 son privadas. Ante esa diferencia en los currículums de estudio y las exigencias, creemos que la reválida directa, amén de las materias como legislación, no se

plantea como válida. Debemos también plantearnos ante los títulos de posgraduación y su reconocimiento.

El tema de honorarios y su fiscalización, en el cual la SMVU pretende que se apliquen los de lugar de actuación debe definirse. La relación entre los Colegios, que regulan la actividad de los profesionales y la necesidad de que se implanten en los dos países que no están aún colegiados, Uruguay y Paraguay fueron mencionados especialmente en las conclusiones de este panel.

Las conclusiones de ese Panel fueron generar un grupo de trabajo reconocido por los gobiernos, que deberá definir las bases del sistema de evaluación de Facultades, de reconocimiento de títulos profesionales y proponer acciones de mejoramiento académico. La meta sería lograr que ese grupo de trabajo sea quien asesore a los gobiernos en estas materias.

En el Panel de Educación, se analizaron las diferencias entre las Facultades y la necesidad de establecer un grupo de trabajo entre un delegado de cada Colegio y un delegado de cada grupo de facultades para coordinar todas estas actividades.

Una vez que ese grupo analice la situación, se recomienda que se propongan condiciones

de ingreso a la carrera y condiciones mínimas de cursos de grado, como paso previo al estudio de un Plan de Estudios en común. Se propone también el intercambio de docentes y administradores, así como profesionales y estudiantes.

Por último, el Panel del Veterinario y las Campañas Sanitarias marcaron que la línea de trabajo que ha tomado Uruguay con las Conhasas y las Codesas es perfectamente viable. Hagamos un paréntesis para informar que aunque todavía no se ha logrado que el MGAP dicte el decreto que reglamente la actuación de la profesión en las campañas sanitarias, este está próximo a salir y será definitivo su rol en las campañas de garrapata y de sarna.

El panel recomendó además dar énfasis al desarrollo interdisciplinario de la sanidad animal, definir prioridades regionales de acción e incentivar la integración de las actividades sanitarias entre los países signatarios.

Se dieron también recomendaciones en otras dos áreas que quiero mencionar. En el área de ecología y manejo de fauna, es necesario que reconozcamos que los sistemas de producción han causado daños al medio ambiente. Reconocer que estos daños son posibles para establecer objetivos de desarrollo que tengan respeto por el hombre y el medio ambiente.

En el panel de aspectos gerenciales de control de calidad, rescato la necesidad que la

profesión se forme en los conceptos de calidad total. La industria reconoce las virtudes de los profesionales, pero el desafío del futuro es importante en este campo.

Hemos recorrido cinco años entre congresos que fueron años de una gran actividad profesional y gremial, con grandes logros y que ha puesto a la profesión veterinaria en posición de entrar a alternar en los grandes problemas que se enfrenta en su accionar.

Queda un gran trabajo a realizar en los próximos cinco años, y en ese momento, en el VI Congreso estaremos quizás ya integrados al Mercosur, y el Congreso será regional.

El año que viene es año de elecciones en la SMVU y desde ya con todos los desafíos con que nos enfrentamos, incluyendo la modernización y reorganización administrativa docente de la Facultad, esperemos una gran participación en las mismas, con la presentación de varias listas que den una lucha electoral sana y que movilice a la masa gremial.

Debemos en ese camino lograr la aprobación del Colegio de Medicina Veterinaria y resolver si la SMVU seguirá funcionando como hasta ahora o lograremos entrar en el camino de la Federación.

Quiero como Presidente, en mi nombre y en el de la Comisión Directiva que me acompaña agradecer a todos los que colaboraron con la SMVU en este año.

Babesiosis-Anaplasmosis en el área de acción del Laboratorio Regional Noroeste Paysandú Período: 1980-1990

Quintana, S.*; Liuzzi, B.**; Fabregas, B**

RESUMEN

Se describe la distribución geográfica y prevalencia de Babesiosis y Anaplasmosis en el área del Laboratorio Regional Noroeste Paysandú, durante el período: Enero/80 - Diciembre/90.

Se destaca la estacionalidad de los brotes de Hemoparásitos, presentándose Babesiosis fundamentalmente durante todo el otoño y Anaplasmosis durante el invierno.

De los brotes de Babesiosis, el 91% correspondió a *Babesia bovis* y sólo el 9% a *Babesia bigemina*.

Concluimos que los principales Hemoparásitos causantes de enfermedad y muerte en el área de acción son: *B. bovis*, *A. marginale* y una menor importancia *B. trigemina*.

Palabras clave: BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, ANAPLASMA MARGINALE, BOOPHILUS MICROPLUS, BOVINOS.

SUMMARY

A picture of the geographic distribution and prevalence of Babesiosis and Anaplasmosis in the area of influence of the Northwest Regional Laboratory of Paysandú in the period going from January 1980 to December 1990 is given.

Seasonality of the outbreaks is remarkable. Babesiosis occurring mainly in autumn and Anaplasmosis in winter.

Babesia bovis was the causative agent in 91% of the cases and only 9% were caused by *Babesia bigemina*.

We arrived to the conclusion that the main hemoparasites causing disease and mortality in our area of influence are *B. bovis*, *A. marginale* and *B. bigemina* being the latter less important.

Key words BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, ANAPLASMA MARGINALE, BOOPHILUS MICROPLUS, CATTLE.

* DMV Técnico del Laboratorio Regional Pdú. D.I.LA.V.E. "Miguel C. Rubino"

** Ayudante Técnico del Laboratorio Regional Pdú. D.I.LA.V.E. "Miguel C. Rubino"

USE LA CABEZA.



USE IVOMEC

MSD AGVET
División de Merck Sharp & Dohme



cibeles

12 de Diciembre 767
Tels.: 201278 - 291001 - 206231



INTRODUCCION

El síndrome "Tristeza Bovina" (TB), comprende dos entidades nosológicas diferentes: BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS.

Los agentes etiológicos diagnosticados en nuestro país incluyen: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*.

La distribución es muy amplia considerándose como zona endémica el territorio comprendido al norte y sureste del Río Negro, existiendo casos de "TB" en el resto del país, debido principalmente a la comercialización del ganado. Su comportamiento epidemiológico, está relacionado a la presencia del principal vector de los hemoparásitos, el *Boophilus microplus*. (21)

Todo el territorio nacional, se encuentra en la zona sub-tropical del Hemisferio Occidental, entre los paralelos 30° y 35° Lat. Sur, posee escasa superficie 176.215 Km², clima templado, en que los valores promedios anuales de temperatura y precipitación, promedian los 18°C y 1200 mm respectivamente. La ausencia de grandes accidentes orográficos, hacen que los parámetros meteorológicos sean una constante a través del año. Estas características y estudios ecológicos realizados por el Dpto. de Parasitología de D.I.L.A.V.E. "Miguel C. Rubino", han demostrado que el *B. microplus* sólo logra desarrollar 2.5 a 3 generaciones anuales, determinando un "área marginal" para su evolución.

Este complejo parasitario adquiere considerable importancia económica, en países que como el nuestro, la producción bovina constituye un rubro destacable en la economía nacional.

La morbilidad y mortalidad, provoca graves pérdidas en la



producción de carne, leche, reposición y atraso en el desarrollo de los rodeos afectados, esto conlleva a la necesidad de elaborar programas de control tendientes a la prevención de esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo es mostrar la prevalencia y distribución de Babesiosis y Anaplasmosis, a través del diagnóstico directo, en el área de acción del Laboratorio Regional Noroeste durante 10 años. (Fig 1)

EPIDEMIOLOGIA

Para establecer un eficaz control de enfermedades transmitidas por *B. microplus*, es imprescindible conocer los diferentes y múltiples factores que intervienen en su epizootología y que determinan el CUANDO, COMO, DONDE Y PORQUE ocurren las mismas.

Los brotes de hemoparásitos se producen en circunstancias definidas y las situaciones pueden ser

(7), (23):

* Introducción de bovinos susceptibles en áreas enzoóticas provenientes de zonas libres.

* Introducción de garrapatas en áreas libres.

* Situación de inestabilidad enzoótica: casos en que la garrapata por causas ecológicas o presiones de baño, modifica su población.

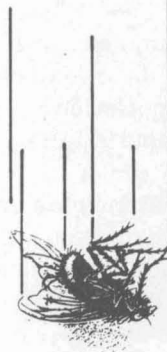
De acuerdo a la casuística obtenida, las categorías de bovinos afectadas por el síndrome "TB", ha correspondido a animales adultos, fundamentalmente: vacas de cría, vaquillonas y novillos. (Cuadro 1)

Cuadro 1

TOTAL DE CASOS	CATEGORIA AFECTADA	
	TERNERO	ADULTO
239	0%	100%

DOMINATOR

... y al cuerno
con la mosca



DOMINATOR -insecticida en **caravanas**-, protege contra la MOSCA DEL CUERNO durante 5 meses, inclusive moscas resistentes a insecticidas piretroides. DOMINATOR es seguro para todas las razas, sexo o edades, aún en ganado lechero fuera del período de producción.



COOPERS
Una Compañía Pitman-Moore

dedicada exclusivamente a la salud y productividad animal en todo el mundo.

Este comportamiento epidemiológico, nos revela que la población bovina adulta es susceptible y está en situación de riesgo permanente en adquirir la enfermedad en forma aguda, creando así un estado de "INESTABILIDAD ENZOOTICA", (6), (12), (21).

Ello es consecuencia, en que el tamaño de las poblaciones de garrapatas obtenidas anualmente son escasas, haciendo que no todos los bovinos durante sus primeros 9 meses de vida puedan adquirir la infección tempranamente. De esta manera, se puede generar inmunidad natural en la población creando un estado de "ESTABILIDAD ENZOOTICA" (6), (12), (21).

Comprobamos la estacionalidad de esta entidad nosológica, la cual coincide con períodos críticos del ciclo ganadero y con un marcado déficit de pasturas (cantidad, calidad), suelos enmalezados, muy pobres en minerales, lo que agrava aún más el panorama productivo de nuestros rodeos.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Los casos de Babesiosis y Anaplasmosis, diagnosticados en el área de influencia del Lab. Regional durante el período Enero/80 - Diciembre/90, provienen de una vasta zona situada al oeste de los departamentos de: Artigas, Salto, Paysandú y Río Negro. (Fig. 2)

El mayor número de casos registrados, pertenecen a los departamentos de Paysandú y Río Negro. (Fig 3)

Este relevamiento, nos ha permitido conocer el porcentaje de establecimientos, que según su razón social, se ven afectados en más, por esta patología.

Así, observamos que existe un mayor porcentaje de establecimientos dedicados a la ganadería positivos a "TB" con respecto a establecimientos lecheros. (Cuadro 2)

Concretamente, en el Dpto. de Paysandú podemos circunscribir una vasta región donde el N° de casos de "TB" se da en mayor cuantía, la misma se sitúa al centro-oeste del Dpto. donde existen 180 establecimientos lecheros con una población bovina de aproxima-

DISTRIBUCION ESTACIONAL

Por los datos procesados en nuestro Laboratorio, hemos comprobado que los brotes de Hematozoarios, tiene mayor prevalencia durante el otoño e invierno.

Babesiosis se presenta fundamentalmente en otoño (Fig.4). Este comportamiento coincide con la mayor disponibilidad de larvas de *B. microplus* en pasturas,

TOTAL ESTABLECIMIENTOS POSITIVOS "TB"	DPTO.	% POSITIVOS "TB" SEGUN "RAZON SOCIAL"	
		LECHERIA	GANADERIA
185	PAYSANDU	40.5%	59.4%
40	RIO NEGRO	47.5%	52.5%

damente 15.464 animales y 1028 establecimientos de orientación ganadera, con una población bovina de aproximadamente 271.984 animales.

En nuestro departamento el área endémica corresponde a una característica edafológica, de praderas heterogéneas, suelos profundos y livianos, claros a oscuros, conformando un excelente biotopo natural para la sobrevida y desarrollo de las formas libres de *B. microplus*.

La distribución de focos de Babesiosis y Anaplasmosis, se correlaciona con la distribución de focos de garrapatas en la zona relevada del Dpto. de Paysandú. En el caso de Anaplasmosis, se mantiene una tendencia similar a la del resto del país, lo que sugiere que *B. microplus* es un vector más de su transmisión.

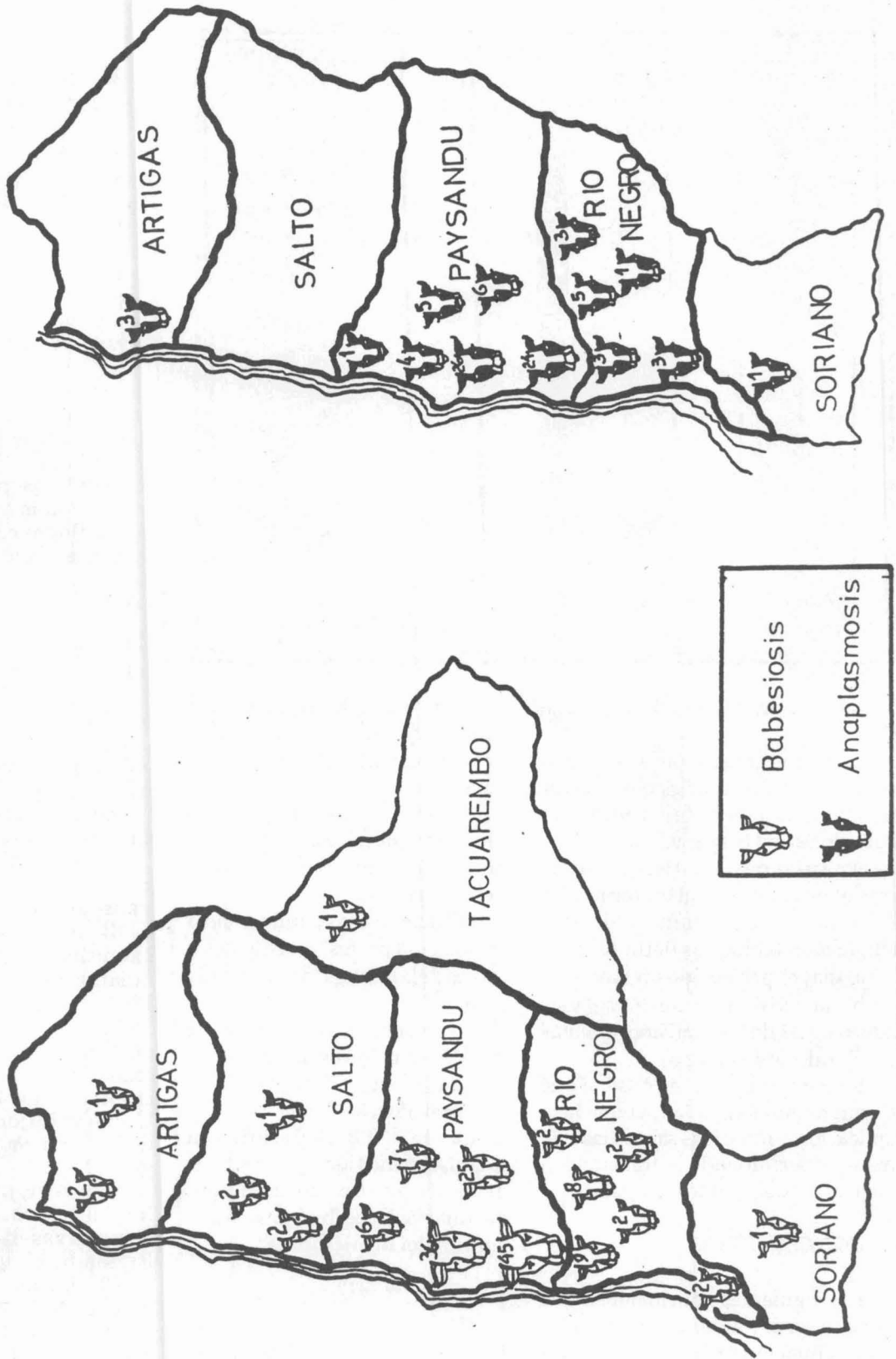
fundamentalmente durante los meses de abril y mayo. En esta época, la población de garrapatas constituye la 3a. generación, originada por larvas y huevos que permanecieron en "refugio" durante el verano, y de teleóginas caídas durante los meses de enero, febrero y marzo. Destacamos que los agentes etiológicos que prevalecen en los brotes de "TB", son fundamentalmente: *B. bovis* y *A. marginale*. (Fig. 5)

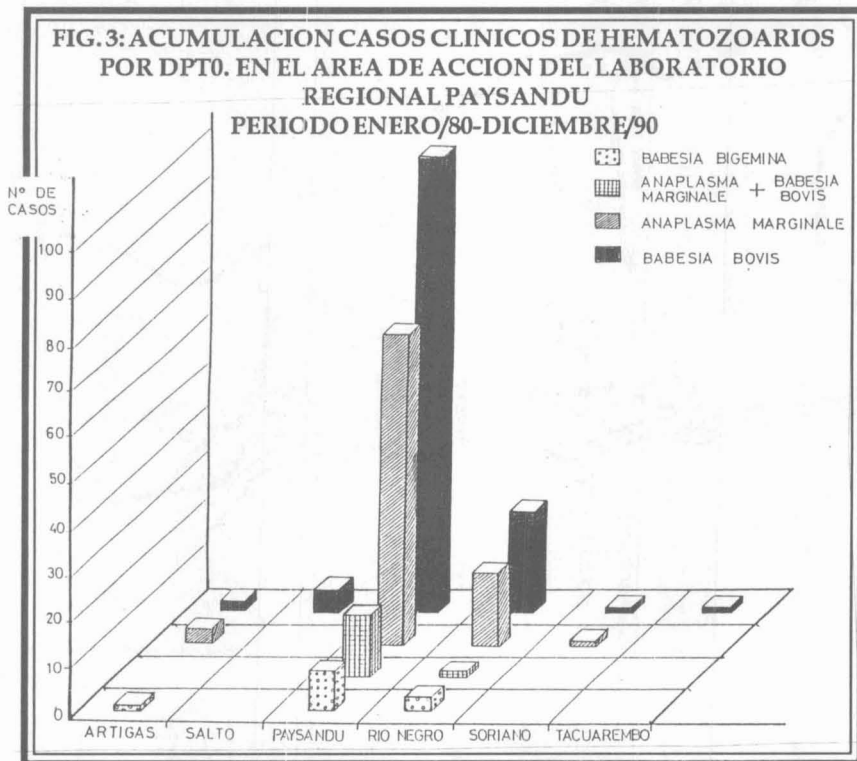
Los casos ocasionados por *B. bigemina*, adquieren importancia relativa en el contexto de la casuística obtenida. Del total de brotes de Babesiosis, el 91% correspondieron a *B. bovis* y sólo el 9% a *B. bigemina*.

Estudios realizados por el Dpto. de Parasitología de D.I.L.A.V.E. "Miguel C. Rubino", llegaron a la conclusión que por cada 9 casos de

FIG.2: DISTRIBUCION BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS EN EL AREA DE ACCION DEL LABORATORIO REGIONAL PAYSANDU

PERIODO: ENERO/80 - DICIEMBRE/90





B. bovis, se produce 1 a **B. bigemina** (21)

Debemos considerar a **B. bovis**, como el agente etiológico de mayor trascendencia en los brotes de Babesiosis en Uruguay.

Anaplasmosis, tiene mayor prevalencia durante el invierno. (Fig 4). Ello es consecuencia de dos situaciones biológicas definidas:

- a) mayor período de prepatencia.
- b) la existencia de otras vías alternativas de transmisión, además del **B. microplus**. (Fig 6)

En Anaplasmosis, es posible que hayan tenido marcada incidencia la aplicación de medidas sanitarias y de manejo, permitiendo la transmisión horizontal del agente nosógeno.

CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones que pueden ser extraídas de este estudio sobre situación epidemiológica, las resumimos en:

* La "TB" está ampliamente distribuida en el área de acción del Laboratorio Regional Paysandú.

* La "TB" es un proceso dinámico que necesita contar con un permanente apoyo diagnóstico del Laboratorio

* El diagnóstico se fundamenta en la acción profesional directa, a través de la asistencia planificada o no.

* El conocimiento exhaustivo de:

- distribución estacional
- incidencia
- prevalencia

de la "TB", permitirán establecer medidas preventivas específicas de control (ej. vacunación) combinadas con el control del **B. microplus**.

AGRADECIMIENTOS

* Dr. Nari, A., Dra Solari, A.; Dra. L de Larrosa; Sra. T. de Giamberini, L.; Srta. Macchi, C.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alonso, M; Blandino, T. Anaplasmosis bovina. La Habana, Consejo Científico Veterinario de Cuba, 1988.

2. Brown, P. Anaplasmosis y el control de Anaplasmosis y Babesiosis. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 7a., Paysandú, Uruguay, 1979.

3. Callow, L.L. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. Rev. mund. zoot. n° 18:9-15, 1976.

4. Carballo, M. Enfermedades transmitidas por garrapatas e importancia económica de **Boophilus microplus**. In: Manejo de baños y estudio de resistencia de garrapatas. Pando, Uruguay, FAO, 1981.

5. Cardozo, H. et al. Estudios sobre ecología del **Boophilus microplus** en tres áreas enzóticas del Uruguay. Veterinaria nos. 86-87, 1984.

6. -----; Nari, A. Aspectos epizootológicos en el control del parasitismo de bovinos de leche. Hemoparásitos. Pando, Uruguay, CIVET "Miguel C. Rubino", 1979.

7. -----; et al. Premunición de ganados generales para el transporte hacia áreas enzóticas de **B. microplus**. In: Jornadas Latinoamericanas y Uruguayas de Buiatría, 8a., Paysandú, Uruguay, 1980.

8. -----; et al. Estudio epizootológico de los Hematozoarios transmitidos por **B. microplus** en un área endémica del Uruguay. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 9a., Paysandú, Uruguay, 1981.

9. Euzeby, J. Las Babesiosis de los bovinos. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 7a., Paysandú, Uruguay, 1979.

10. Hadani, A. Epidemiología de la Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Métodos inmunoprofilácticos. Salta, FAO, INTA, 1978.

Fig.1 PERFIL DE PRESENTACION DE BABESIOSIS-ANAPLASMOSIS Y DISTRIBUCION DE BOOPHILUS MICROPLUS SEGUN EPOCA DEL AÑO EN EL AREA DE ACCION DEL LABORATORIO REGIONAL PAYSANDU PERIODO: ENERO/80-DICIEMBRE/90

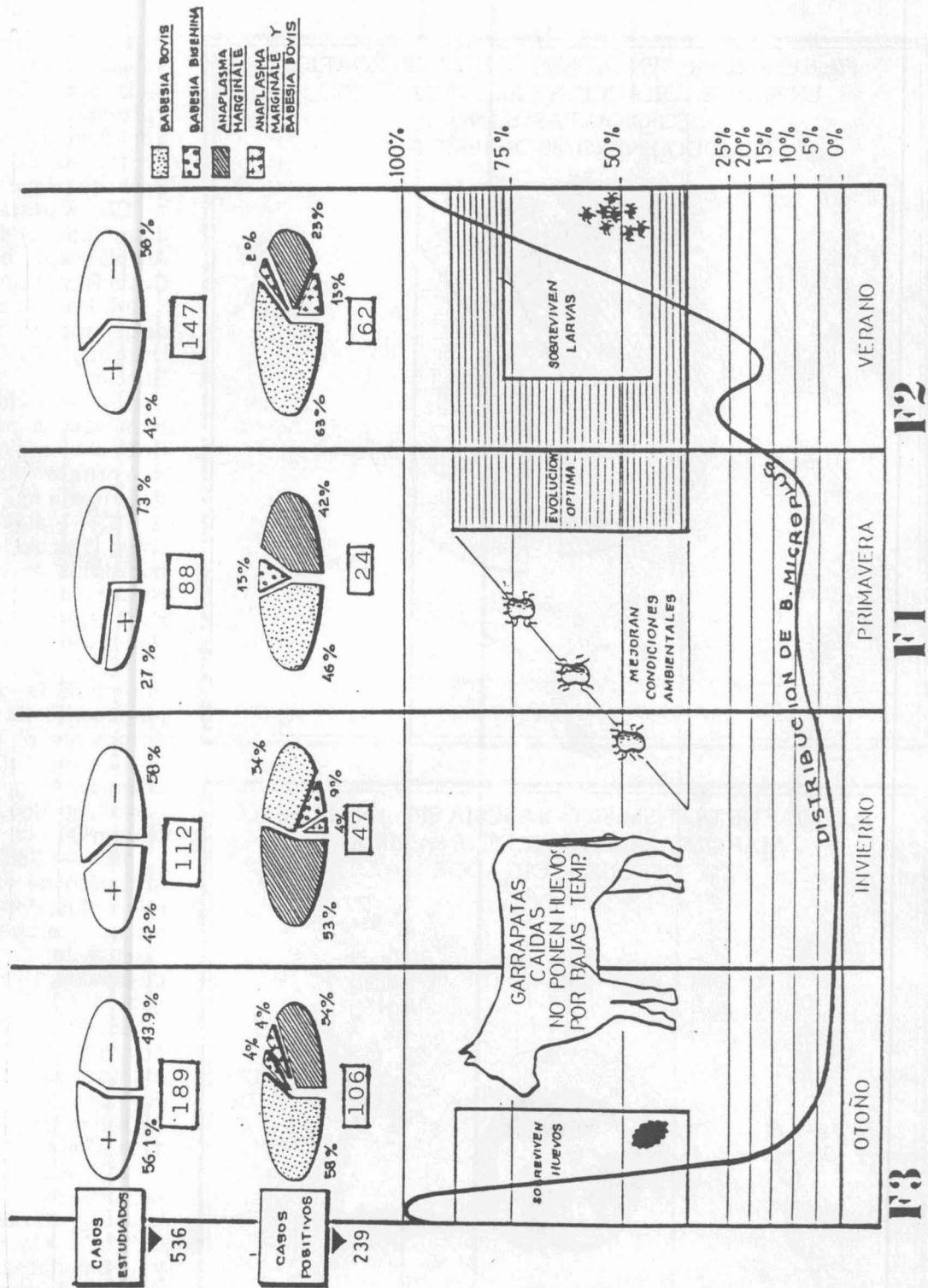


Fig. 5 PERFIL PRESENTACION DE HEMATOZOARIOS EN EL AREA DE ACCION DEL LABORATORIO REGIONAL PAYSANDU PERIODO: ENERO/80-DICIEMBRE/90

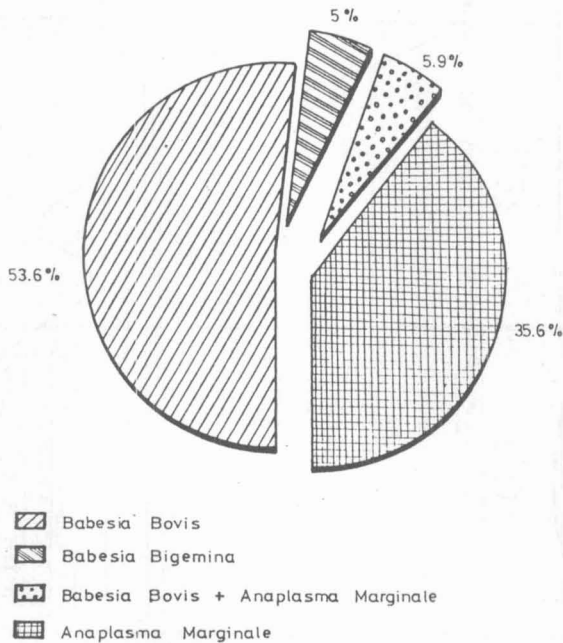
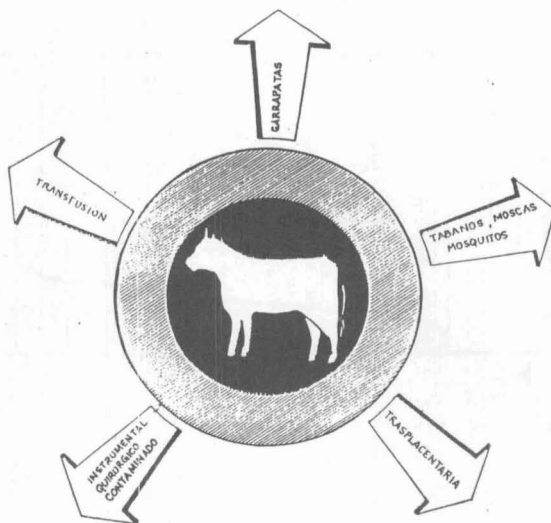


Fig. 6: VIAS DE TRANSMISION BABESIA SPP-ANAPLASMA MARGINALE A PARTIR DE UN ANIMAL ENFERMO-PORTADOR



11.-----; Anaplasmosis bovina. Rafaela, Santa Fe, FAO, INTA, 1978

12. Mahoney, D.F., Ross, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine Babesiosis. A.V.A. Protocolo de la Conferencia Brisbane, Mayo 1972.

13. Manual de técnicas diagnósticas de Babesiosis y Anaplasmosis bovina. San José, Costa Rica, IICA, 1987.

14. Nari, A. Ecología y control de garrapatas en Uruguay. Pando, Uruguay, CIVET "Miguel C. Rubino".

15. -----; Solari, M.; Cardozo, H. Hemovacuna para el control de Babesia spp. y Anaplasma marginale en el Uruguay. Veterinaria nº 71, 1979.

16. -----; et al. Estudio preliminar sobre la ecología del Boophilus microplus en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. Veterinaria 1969.

17. -----; et al. Cómo conocer al enemigo: la garrapata. Ciclo parasitario. Rev. actual. técn. agropecua. nº 33, set. 1986.

18. -----; et al. Cómo conocer al enemigo: la garrapata. Ciclo no parasitario. Rev. actual. técn. agropecu. nº 34, oct. 1986.

19. -----; Solari, M. Desarrollo y utilización de vacunas contra B. microplus; Babesiosis y Anaplasmosis. Perspectiva actual en Uruguay. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 18as., Paysandú, Uruguay, 1990

20. Rivero, R. et al. Principales enfermedades diagnosticadas en el área de influencia del Laboratorio Regional de Paysandú. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría, 17as., Paysandú, Uruguay, 1989.

21. Solari, M. Aspectos epidemiológicos de babesiosis en Uruguay. México, FAO, 1987.

22. Soulsby, E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7a. ed. 1987.

23. Uilenberg, G. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. Epizootología. Rev. mund. zoot. 1978.

Amplificación de ADN in vitro (PCR): instrumentación y metodología básica

Hirigoyen D. (1) Bruzzoni Giovanelli H. (1) Azambuja C. (2) Stoll M. (1) (2)

RESUMEN

Desde la corta existencia de la biología molecular como ciencia varios aportes han impulsado la vertiginosa revolución tecnológica a la que hoy asistimos. La amplificación de ADN in vitro (PCR) es una poderosa técnica que permite identificar nuevos genes, así como cuantificar y caracterizar secuencias nucleotídicas. En este trabajo se presenta una breve descripción del revolucionario método (PCR), capaz de estimular la investigación científica en todos los órdenes y modificar el área diagnóstica en un futuro próximo. Se plantean brevemente algunos de los recientes desarrollos en su instrumentación y metodología.

Palabras clave: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA, AMPLIFICACION DE ADN, TECNICAS BIOQUIMICAS, GENES

INTRODUCCION

La REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), es un nuevo y poderoso método de síntesis enzimática "in vitro" de ADN que permite amplificar velozmente segmentos de ácidos nucleicos copiándolos millones de veces en pocas horas. Su uso y popularidad está creciendo rápidamente en la medida que se exploran nuevos campos de aplicabilidad.

La técnica fue desarrollada en 1985 por un grupo del Departamento de Genética Humana de CETUS Corporation en Emeryville, California para la amplificación del gen de la B-globina humana (17) y diagnóstico prenatal de la anemia falciforme. (2) (19)

Avances simultáneos en el campo de caracterización y purificación de proteínas así como el avance de la técnica, surgiendo

rápidamente diversas aplicaciones en el campo de la biología molecular y esfera diagnóstica, como lo indican la gran variedad de publicaciones que se reportan.

Es la intención de este trabajo introducir a los lectores en el manejo de esta poderosa herramienta molecular, describir su desarrollo, factores limitantes y etapas críticas, de la manipulación y del diseño experimental.

DESCRIPCION DE LA TECNICA DE AMPLIFICACION IN VITRO DE ADN (PCR)

El principio del método de PCR (fig. 1) es una amplificación enzimática de secuencias de ADN que son flanqueadas por 2 oligonucleótidos (primers) que hibridizan en hebras opuestas de la secuencia a amplificar.

SUMMARY

During the short time in which molecular biology exists as a science, several contributions have been made to improve the technical revolution we are attending nowadays.

The DNA Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technic that allows to indentify new genes, to quantify and characterize nucleotid secuencias.

This paper makes a brief description of a revolutionary method that may improve scientific research and may modify diagnostic areas in a close future. Some of the recent developments, its instrumentation and methodology are established here.

Key Eords POLYMERASE CHAIN REACTION, DNA AMPLIFICATION, BIOCHEMICAL TECHNIQUES, GENES

Los oligonucleótidos sintéticos tiene generalmente un tamaño que oscila entre los 10 y 30 bases de largo. Cuando las 2 hebras de ADN blanco se ha separado (desnaturalizado), los oligonucleótidos hibridizan en cadenas antiparalelas con sus extremos 3' orientados hacia el centro del segmento a amplificar. La DNA-Polimerasa lee la información contenida en la hebra molde (templado) y va extendiendo la hebra en formación por incorporación de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) en los extremos 3' de cada cadena (fig. 2). De esta manera se genera un par de secuencias complementarias al ADN molde original que pasarán a enriquecer el próximo ciclo de amplificación actuando como nuevos templados.

Sucesivos ciclos que constan de distintas fases: 1) desnaturalización del ADN, 2) Hibridización del primer, y 3) extensión por la DNA polimerasa-, se repiten uno a otro,

1) División Citogenética. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE). Avda Italia 3318

2) Departamento de Biotecnología. Estación Experimental "Las Brujas" INIA. Dpto. de Canelones

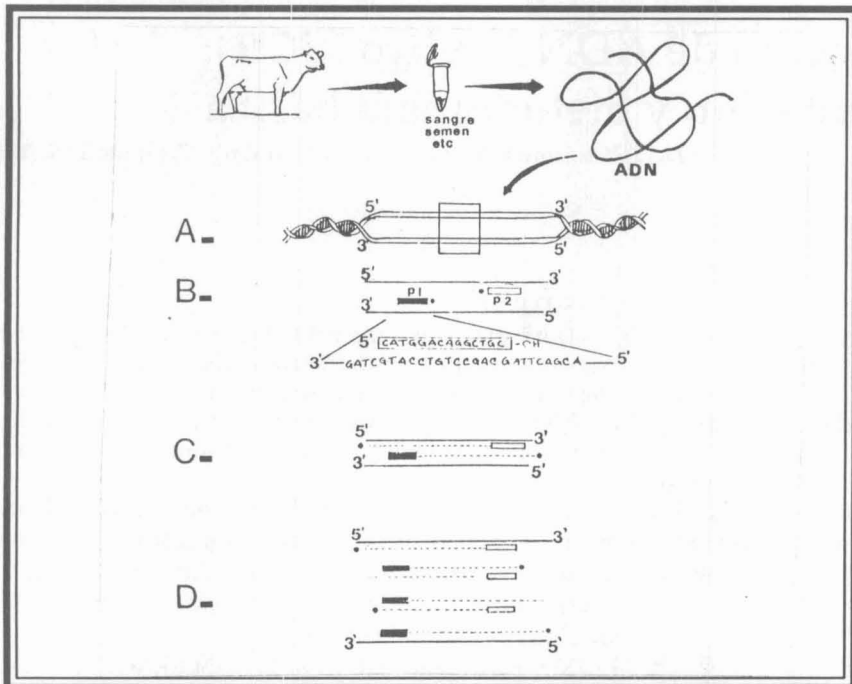
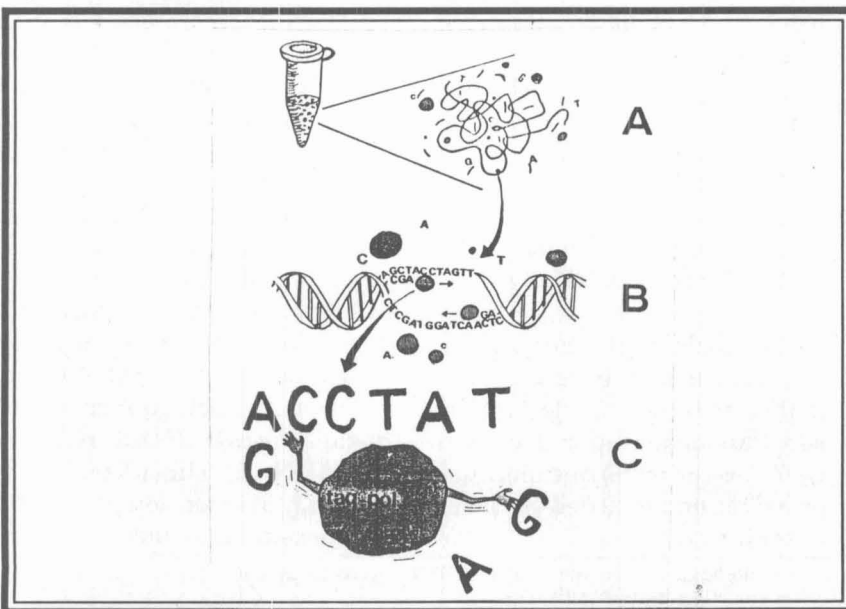


Fig. 1. El ADN puede extraerse de diferentes fuentes celulares por técnicas convencionales. A) La secuencia a amplificar de la molécula de ADN doble hebra aparece indicada dentro del recuadro. B) Luego que el ADN se ha desnaturalizado los 2 oligonucleótidos (P1 y P2) se pegan a las zonas que le son complementarias, flanqueando el fragmento deseado. Se observa un detalle del apareamiento del oligonucleótido con la hebra de ADN que figura dentro del recuadro. C) La Polimerasa extiende los 2 oligonucleótidos, copiando las hebras moldes. D) En este segundo ciclo de PCR, cada una de las cuatro hebras mostradas en C, aparecen unidas a nuevas moléculas de oligonucleótidos, y van a ser también extendidas. Así al final de este segundo ciclo se obtiene cuatro copias doble hebra que son idénticas a las iniciales. Estos productos se van acumulando exponencialmente durante los sucesivos ciclos.



con temperaturas apropiadas logrando la polimerización de nuevas copias de ADN que incrementan el producto final.

La reacción puede efectuarse en hebras simples o dobles de ADN, así como ADN complementario (ADNc) originado por transcripción reversa de ARN.

El producto generado durante la amplificación tiene una longitud que es igual a la suma de las longitudes de las 2 primeras, más la distancia entre ambos.

Este método de síntesis "in vitro" altamente preciso y eficaz permite en teoría duplicar el número de copias de las hebras de ADN en cada ciclo.

Como el producto obtenido de esa síntesis sirve de modelo para los siguientes, cada vez que se repiten los mismos la cantidad de secuencias amplificadas se incrementa por $2n$, donde (n) es el número de ciclos (fig.3). De esta manera un PCR de 20 ciclos producirá en teoría al cabo de 2 horas aproximadamente una amplificación de un millón de veces, (2^{20})

Fig. 2. En el seno de la muestra a amplificar se establecen diversas interacciones entre los componentes. A) Se esquematizan las moléculas de ADN que sirven de molde, los dNTPs, sustrato para que las nuevas hebras crezcan, los oligonucleótidos que inician el evento de neoformación y la enzima que polimeriza la reacción. B) Luego de desnaturalizar las hebras de ADN los oligonucleótidos y las moléculas de enzima se disponen entre las cadenas separadas donde tiene lugar la copia de nuevas cadenas, basadas en la información del molde. C) La enzima trabajando en condiciones de pH y fuerza iónica proporcionadas por su buffer, capta del medio dNTPs y los incorpora a partir del extremo 3' del oligonucleótido, donde se establecen sucesivos enlaces fosfodiéster que integran la nueva cadena.

COMPONENTES DE LA REACCION

El desarrollo del PCR involucra básicamente la combinación de una muestra de ADN, oligonucleótidos, dNTPs y la enzima Taq Polimerasa con su buffer, los cuales se someten a reiterados ciclos de aumento de temperatura y enfriamiento.

De lo anterior se deduce que las complejas interacciones cinéticas y bioquímicas que tienen lugar entre los componentes de la reacción determinan la calidad del producto y por consiguiente el correcto ajuste de los mismos.

A continuación se analizan varios de los elementos que se deben tener en cuenta para realizar una amplificación tipo de ADN.

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS

Los iniciadores de la reacción "oligonucleótidos" son pequeños segmentos de ADN de 10 a 30 bases en promedio, imprescindibles para la correcta amplificación de segmentos génicos.

Existen publicados bancos de secuencias génicas donde figuran la composición en bases de los diferentes genes animales, vegetales, humanos, de agentes microbianos, etc.

Es posible acceder a ellos para efectuar consultas buscando la o las regiones más adecuadas en el diseño de los oligonucleótidos, seleccionando aquellas zonas que permitan amplificaciones más eficientes.

Para facilitar aún más su diseño

se dispone de programas de computación específicos para los oligonucleótidos, los cuales contemplan el tamaño que debe tener el primer, contenido en Guanina-Citocina, energía libre, lugar y grado de pegado al templado, etc.

Al elegir los 2 oligonucleótidos para PCR es importante que no tengan bases complementarias entre sí, particularmente en los extremos 3' a fin de evitar la incidencia de dimerización entre ellos. Este artefacto de la amplificación, al igual que la formación de estructuras secundarias dentro de cada primer deben tenerse en cuenta porque ambos disminuyen la eficacia de la reacción.

La especificidad del pegado del oligonucleótido al ADN a amplificar es proporcional a la longitud de los mismos, es decir, cuanto más bases

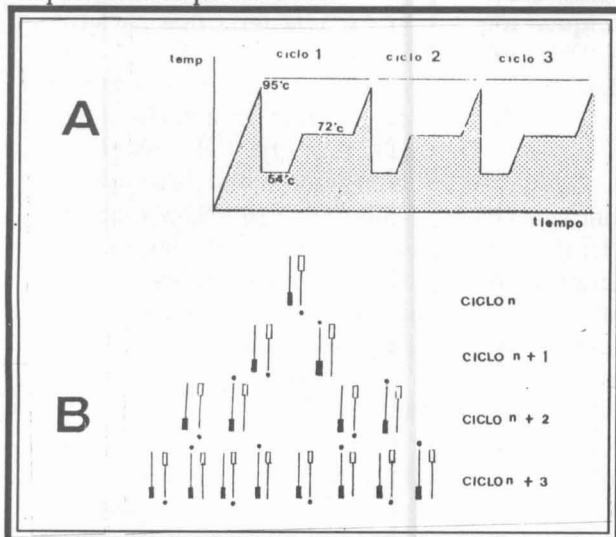


Fig. 3. A) Gráfica del perfil termal con tres ciclos consecutivos de una reacción de PCR convencional. En este ejemplo: se utiliza 95°C para desnaturalizar las dobles hebras de ADN, 54°C para permitir el pegado de los oligonucleótidos a sus sitios complementarios, y 72°C para que la enzima incorpore sNTPs extendiendo la hebra nascente. B) Incremento exponencial de secuencias amplificadas, la cantidad de producto obtenido es función del número de ciclos a que se somete la reacción. Como se indica en el esquema si todas las hebras molde son extendidas en cada ciclo, se obtiene un producto que nuevamente servirá de molde y que es el doble del ciclo anterior. En estas condiciones una reacción de amplificación con 20 ciclos incrementaría los fragmentos aproximadamente un millón de veces.

casa del criador

TIJERA DESVASADORA

TECNOLOGIA ALEMANA

- MAS LIVIANA
- MAS FUERTE

ACERO DE UNA PIEZA. SE COMPRA UNA SOLA VEZ. NO SE AFILA NUNCA.

RENETAS PARA CASCOS

- DE ACERO • MANGO DE MADERA • 5 MODELOS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"

GRAL. FLORES 3269 CASI L.A. DE HERRERA
TELS. 23.60.13 / 20.80.40

tenga el primer menos posibilidad existe de que su secuencia se repita en la hebra molde.

Cuando se realiza la unión de un par de bases Guanina y Citocina (G+C) se hace por 1 puente de hidrógeno más que el par Adenina-Timina (A+T), volviendo la unión más estable.

Basado en esto se busca que los oligonucleótidos tengan un mayor contenido en G y C que de A y T, así se asegura una buena hibridación del complejo oligo-templado.

Las amplificaciones convencionales (PCR simétrico) utilizan la misma concentración de cada oligonucleótido, sin embargo cuando se hace PCR asimétrico se efectúan amplificaciones con uno de los dos primers en concentración limitante. De esta forma luego de 10 o 15 ciclos uno de los oligonucleótidos disminuye y en los ciclos restantes se generan copias solamente de una hebra del ADN original (9). Este método se puede efectuar en 2 etapas, o bien en una sola colocando inicialmente una relación desequilibrada en la concentración molar de primers.

Con este encare metodológico se puede efectuar el secuenciamiento de la hebra amplificada (13) (14).

Los oligonucleótidos al igual que las proteínas y los anticuerpos permiten diseñar interesantes estrategias de acoplamiento de sustratos.

Es posible la adición de información sin alterar la reacción de amplificación, por ejemplo, secuencias no complementarias al templado que se fijan en el extremo 5' de los oligonucleótidos y que se incorporan en el producto amplificado bajo forma de nuevos sitios de restricción enzimática (20) o elementos regulatorios (promotores).

Se pueden marcar los oligo-

nucleótidos con fluorocromos (Isotiocianato de Fluoresceína), Rodamina, etc) o componentes enzimáticos (Biotina, etc), desarrollando ingeniosos ensayos de complementación de colores que permiten distinguir varios agentes infecciosos o distintos loci de ADN amplificados simultáneamente (3)

Con la utilización de oligonucleótidos diseñados al azar, que pegan arbitrariamente en diferentes zonas del ADN también es posible encarar un rastreo genómico, identificado los patrones de bandas genotipo específicos obtenidos luego de una amplificación con estos primers (1) (24).

Este es uno de los más recientes careos de mapeo genómico por PCR que se viene llevando a cabo con múltiples aplicaciones entre los que se destacan el identificar marcadores que identifiquen loci asociados a caracteres de interés productivo. (11) (12) (23).

ENZIMAS

Inicialmente la amplificación del ADN se efectuaba con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (16), una enzima que se inactiva con altas temperaturas a las que se somete la reacción para desnaturalizar el ADN en cada ciclo.

Hoy gracias a la existencia de microorganismos arqueobacteriales termofílicos capaces de crecer a 70° y 75°, y al ingenio del hombre por reconocer su aplicabilidad se puede obtener a partir de *Thermophilus aquaticus*, cepa YT1, aislada de un geiser en Yellowstone National Park (2), enzimas que trabajan con temperaturas óptimas más elevadas (18).

Con esta enzima, y otras comercialmente disponibles, ya sea naturales o recombinantes, se simplifica su adición una sola vez,

permitiendo que la enzima "fotocopie" el ADN en millones de ejemplares mejorando la especificidad del producto amplificado.

Estas polimerasas son muy rápidas llegando en el caso de la Taq ADN Polimerasa a sintetizar aproximadamente 150 nucleótidos /segundo /mol de enzima. (8)

La Taq Polimerasa nativa purificada de *Thermophilus aquaticus* existe de forma recombinante expresada en *E. coli*, presentando ambas actividad 5'-3' exonucleásica equivalente.

Se estima que el porcentaje de incorporación errónea por parte de estas durante cada ciclo es de una base cada 10⁴ nucleótidos (18), variando esta cifra según sean las condiciones en que se efectúe la reacción (4).

La Vent-Polimerasa obtenida de una Archibacteria marina termofílica *Thermococcus litoralis* ofrece una mayor resistencia térmica, pero también mayor actividad exonucleásica que debe tenerse en cuenta al momento de su uso.

Sin embargo, están surgiendo nuevas enzimas mutadas para estas actividades exonucleásicas que reúnen mejores condiciones de termoestabilidad.

Hay enzimas que poseen además de la función polimerizante actividad de transcriptasa reversa, permitiendo obtener eficientemente cADN directamente de ARN (15), luego amplificarlo en un simple tubo, con tan sólo modificar las condiciones iónicas.

Tienen la ventaja de que funcionan a elevadas temperaturas desestabilizándose las regiones secundarias de RNA y superando los problemas vistos con la Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina (RT).

OBTENCION Y TIPOS DE MUESTRAS

La efectividad de la reacción depende del estado de pureza en que se encuentra la muestra que se va a analizar. Es posible efectuar diagnósticos a partir de muestras crudas o semiprosesada sin necesidad de extraer totalmente el ADN, al tratar los especímenes con algunos detergentes y solventes que los exponen facilitando la reacción de amplificación. Entre los especímenes a analizar se cuentan sangre entera, suero, leche, semen, detritus celulares, médula ósea, restos tisulares en diferentes grados de descomposición, etc. (7) (10). También es posible rastrear patógenos en aguas residuales donde existe bastante materia orgánica agregada, o en alimentos

donde es similar el caso.

Debido a la enorme capacidad amplificadora del método, se pueden generar millones de copias de una secuencia génica, así como de secuencias no deseables. Esto último se ve agudizado fundamentalmente por contaminación con productos de amplificaciones

previas (carry over), o bien material exógeno que incide cuando la secuencia blanco se halla en poca cantidad al iniciarse la reacción.

El carry over ha sido un punto sobre el cual se dirige mucho la atención, pues es posible que la contaminación con secuencias de ADN multiplicadas millones de

TABLA 1. PROCEDIMIENTOS PARA MINIMIZAR LOS ERRORES DE LA REACCION

- * SEPARAR LAS REACCIONES ANTES Y DESPUES DEL PCR
- * ALICUOTAR TODOS LOS REACTIVOS
- * DISPONER CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS
- * USAR PIPETAS DE DESPLAZAMIENTO POSITIVO
- * SELECCIONAR CRITERIOSAMENTE CADA CONTROL
- * EN LO POSIBLE DESTINAR UN AREA EXCLUSIVA PARA PCR

Albendazole polvo

ALBENDAZOLE AL 75%

**Antihelmíntico
de amplio espectro**

LABORATORIO

Revan

Guayaquí 3095 Montevideo

VETERINARIA 17

Vol 28 N° 115 ENERO-MARZO 1992

veces en PCR anteriores puedan interferir con la reacción, al ser vehiculizadas por los buffers, agua, micropipetas de trabajo, etc.

Para reducir estos problemas se prescriben una serie de medidas (5), como las que se resumen en la Tabla 1, y otras que se citan seguidamente: reducir el número de ciclos al mínimo para evitar el aumento del contaminante. Seleccionar con buen criterio los controles positivos y negativos. Colocar tubos sin ADN que permitan detectar productos no deseables.

Usar buffers y reactivos alícuotados; utilización de áreas y micropipetas exclusivas para el desarrollo de la técnica.

Adicionar los distintos componentes de la reacción de amplificación antes de adicionar el ADN.

Tapar cada tubo luego de la adición de ADN y antes de proceder con los otros tubos.

Inactivar el producto con irradiación ultravioleta de corta longitud de onda previa a la amplificación de la mezcla (21).

LIMITES DE LA AMPLIFICACION

El tamaño del fragmento génico capaz de copiarse por la repetición de los ciclos es bastante grande existiendo reportes de fragmentos de 10.2 kb que han podido ser amplificados a partir de tejidos fijados y embebidos en parafina (22). Con la purificación de nuevas y más potentes enzimas, así como con el desarrollo de mejores cicladores (6), se van optimizando las condiciones técnicas de amplificación y por consiguiente aumentando el tamaño de los fragmentos obtenidos; por otro lado el método también va cobrando mayor especificidad.

La atenuación de la velocidad de amplificación exponencial del producto acumulado ocurre en los últimos ciclos, existiendo una marcada caída a partir de los ciclos 30. En este fenómeno la propia enzima determina el agotamiento además de varios otros factores; como ser: 1) utilización de sustratos (dNTPs), enzima, 3) competencia de los reaccionantes por productos no específicos 4) incompletas desnaturalizaciones del producto por aumento de su concentración, 5) polimerización y reanillamiento del producto de la amplificación cuando supera los 10^{-8} moles.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anolles, G.C.; Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. 9:553-557

2. Chehab, F.F.; Doberty, M.; Cair, Kan Yw; Cooper, S.; Rubein, E.M. (1987) Detection of Sick cell anaemia and Thalasseмии. Nature 329:293-294

3. Chehab, F.F. and Kan, Y.W. (1989) Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: A color complementation assay. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9178-9182

4. Eckert, K.A. and T. a. Kunkes (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acids Res. 18:3739

5. Erlich, H.A.; Gelfand D.; Sninsky J.J. (1991) Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. Science 252:1643-51

6) Franco, R.; Augusto, A. and Roberto Salvi (1988) A simple and low cost DNA amplifier. Nucleic Acids Res. 16:3105-3106

7) Gasparin, P.; Savoia, A.;

Pignatti, P.F.; Dalpiccola, B. and Novelli, G. (1989) Amplification of DNA from epithelial cells in urine. New. Engl. J. Med. 320: 809

8) Geifand, D.H. (1989) Taq DNA polymerase PCR technology, Principles and Applications for DNA amplification. Ed. Henry A. Erlich, cap 2:17-22

9) Gyllesten, U.B. and H.A. Erlich (1988) Generation of simple stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7652

10) Hanghira Li; Gyllesten, V.B.; Xiang feng, C.; Saiki, R.K.; Erlich, H.A. and Arheim, N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 335:414-417

11) Hirigoyen, D.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. y M. Stoll (1991) Aplicaciones del PCR al mejoramiento bovino. In: Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 6a., Piriápolis, Uruguay.

12) Lopes, R.F.F.; Perseu, J.A.S.; Bruzzoni, H.; Hirigoyen, D.; Azambuja, C.J.; Termignoni, C; Maia, and M. Stoll (1991) PCR technology applied to the analysis of bovine genome. In: II National and Congress of Biotechnology and I. Latin American fair and Congress of Biotechnology, San Paulo, Brasil.

13) Mazars, G.R.; Mayret, C.; Leanteur, P. and Theillet, C.G. (1991) Direct sequencing by thermal asymmetric PCR. Nucl. Acids Res. 19:4783.

14) Milohilonic, M. and J. E. Lee (1989) An efficient method for sequencing PCR amplified DNA. Biotechniques 7 (1): 14

15) Miyere, T.W. and Gelfand D.H. (1991) Reverse Transcription and DNA amplification by a *thermus thermophilus* DNA

polymerase. Biochemistry 30:7661-65.

16) Mullis, K.B. and F. Falloona (1987) Specifics synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. In: Methods in Enzimology, R. Wu., Ed. Vol 155, p335-350

17) Saiki, R.K.; Bugawan, T.L.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1986) Analysis of enzimatocallu amplified betaglobin and HLa'DQ Alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. Nature 324: 163-166.

18) Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S. et al. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase Science 239: 487-491.

19) Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mulis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. and N. Arnheim (1985). Enzimatic amplification of

betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anaemia. Science 230:1350'1354.

20) Saiki, R.K. (1989) The de-sing and optimization of the PCR. PCR technology by H.A. Erlich p.7-16

21) Sakar, G.; Sommer, S.S. (1990) Shedding lighth on PCR contamination., Nature 343:27.

22) Shibata, D.K.; Martin, J.W. and Arnheim, N. (1988) Analisis of DNA sequences in party-year old paraffin thin'tissue sections: a bridge between molecular biology and clasical histology. Cancer Res. 48: 4564-4566.

23) Welsh and McClelland M. (1990) Fingerprinthig genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids. Res. 18:7213-7218.

24) (Williams, J.G.K.; Kubelic, A.R.; Rafaski, J.A. and Tingey 18: 6531-6535.

SUSCRIPCIONES A LA REVISTA VETERINARIA

ANTEL : 62.08.73c/u N\$ 10.000, anual (4) N\$ 32.000. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente.

Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria

CON **CIENCIA**

EN LA SANIDAD ANIMAL

**LABORATORIO CIENCIA
"EL DE LAS GRANDES MARCAS"**

DERRAMIN

GARRAPATICIDA INSECTICIDA

LUIS A. DE HERRERA 4009 - TELS.: 20 86 74 - 29 69 11

VETERINARIA 19

Vol 28 N° 115 ENERO-MARZO 1992

Carnicerías: competencias legales de los aspectos higiénicos (***)

Pérez Sánchez, R.*; Casaux, G.**

La existencia de una superposición de normas han configurado un mosaico de decisiones y responsabilidades difusas en cuanto a competencias para los controles higiénicos de las carnicerías, lo que lleva a los límites de responsabilidad de los diferentes organismos públicos no estén bien delimitados, con lo cual se ve perjudicado básicamente el consumidor en tanto las condiciones higiénicas en la comercialización que se presentan no son de desear.

INTRODUCCION

Se entiende por carnicería, todo comercio donde se expendan carnes y menudencias al público, al por menor (1).

La comercialización de estos productos no puede hacerse de cualquier forma.

Existe un antiguo principio de que si se parte de una mala materia prima, se llega a un mal producto final, con el riesgo para la salud pública que ello puede producir.

Es común ver en las carnicerías de nuestro país la falta de protección que tiene la carne.

Generalmente se ofrece el producto a su venta al consumidor final, sobre una mesa de mármol, u otro material, sin ningún tipo de protección en cortes ya preparados o semi-preparados, lo que lleva a que la carne en su presentación tenga el máximo contacto con el medio que presenta la carnicería.

Por esta forma tradicional de

presentación los cortes de carne están expuestos al manoseo del público, contacto con insectos, posibilidades de salivarlos, el consumidor puede toser, estornudar sobre la carne, etc, con el riesgo para la salud que ello trae.

La carne es de los productos de mayor riesgo epidemiológico.

También cabe acotar que se corta la cadena de frío, ya que en éste tipo de exposición, sobre la mesa los cortes suelen pasar varias horas, al menos hasta que llega el inocente comprador.

Lo mismo pasa cuando se exhibe la carne en gancheras.

El riesgo de multiplicación de diferentes microorganismos es alto, ya sea que estos provengan de una contaminación inicial o por falta de protección en la exposición.

Veamos un solo ejemplo (por no ser éste el objetivo del trabajo) de la posible contaminación con: *Staphylococcus aureus*, determinadas cepas producen enterotoxinas; lo habitual es que personas portadoras de estafilococos

contaminen directamente los alimentos (secreción nasal, saliva, aerosoles expulsados al toser con infecciones en las vías respiratorias altas, partículas de heridas infectadas, escoriaciones, soluciones de continuidad en la piel, al tocar con la mano). Alrededor de la mitad de todas las personas albergan *St. aureus* en el espacio naso-faríngeo. Las enterotoxinas estafilocócicas son termorresistentes (2).

Al mismo tiempo se produce la alteración de la carne.

Ahora bien, el objetivo del presente trabajo será el tratar de mostrar a quien le corresponden las competencias del control higiénico-sanitario de las carnicerías. Entiéndase que la falta de protección de un alimento esta dentro de los principios higiénicos.

Son tres los organismos estatales con aparente responsabilidad en el tema, el Instituto Nacional de Carnes (INAC), el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), y las

* MDTV, Colaborador de la Cátedra de Legislación Rural y Veterinaria. Facultad de Veterinaria.

** Doctor en Derecho, Profesor Adjunto de Legislación Rural y Veterinaria, Facultad de Veterinaria. Asesor Letrado del MGAP.

(***) Presentado en el 2das. Jornadas de Ciencia y Tecnología de los alimentos -IMM- setiembre 1991.

Intendencias.

METODO

Como metodología hemos utilizado el análisis de las normas retrospectivamente.

El Decreto-Ley N°14.810 del 11 de agosto de 1978 (4), en su artículo 1ro. estableció que sería de competencia privativa del Poder Ejecutivo, la reglamentación de: "La habilitación de establecimientos expendedores de carnes al público, sin perjuicio de la autorización municipal de su ubicación, desde el punto de vista urbanístico".

Dicha reglamentación se hizo efectiva por el Decreto 482/78 del 18 de agosto de 1978 (5), en la que da competencias a la Comisión Administradora de Abasto (CADA) como rectora del mismo.

En dicho reglamento se define que es una carnicería, se detalla los requisitos de los locales, características de los mismos, donde deben inscribirse, quien les dará la habilitación; varios numerales hacen referencias al estado higiénico de las mismas.

El numeral 36 hace mención a que CADA: "...quedando facultada para inspeccionar locales, mercaderías, implementos, útiles y documentación...", "...sin perjuicio de ello, podrá concertar con las Intendencias Municipales y organismos nacionales competentes, la actuación de sus respectivos servicios inspeccionativos...".

Por su parte, el numeral (2) del art. 3 del mismo Decreto-

Ley, derogó lo pertinente el art. 35 de la Ley Organica Municipal N°9515 del 28 de octubre de 1935. Por los literales F,G, y H, del numeral 24 del art. 35 antes citado correspondía a las Intendencias la policía higiénica y sanitaria de mercados, carnicerías y demás establecimientos análogos; la inspección y el análisis de toda clase de sustancias alimenticias; y la inspección veterinaria y adopción de medidas que juzgue necesarias para la garantía de la salud pública.

Los decretos 458/78 (7) y 459(8), ambos del 11 de agosto facultaron a CADA para habilitar locales de venta al público estableciéndose en el art.5. del último de los nombrados lo

siguiente: "A partir de la vigencia del presente decreto será libre la instalación de carnicerías en todo el territorio nacional cumpliéndose con las exigencias constructivas e higiénico-sanitarias reglamentariamente aplicables. La habilitación y control serán ejercidas por el Ministerio de Agricultura y Pesca de acuerdo a las normas establecidas de la aceptabilidad de su ubicación desde el punto de vista urbanístico".

Luego, el 27 de julio de 1984 por el Decreto-Ley 15.605 se crea el Instituto Nacional de Carnes (INAC), como persona pública no estatal. El numeral 5 del literal A del art. 3 determinó entre los cometidos del organismo: "La habilitación, registro y con-

**casa del
criador** RT



**DE
TODO
PARA
EL CRIADOR**

- JERINGAS
- DOSIFICADORES
- ESQUILA
- INSEMINACION

EQUIPOS
INSTRUMENTOS
HERRAMIENTAS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"

GRAL FLORES 3269 CASI L A DE HERREHA
TELS 23 60 13 20 80 40



trol de carnicería y locales de venta al consumidor".

Estas competencias fueron tomadas del Decreto 458/78 y 482/78 al ser el nuevo INAC el "sucesor universal" de CADA y del antiguo "Instituto Nacional de Carnes" creado por el decreto 601/67 del 8 de setiembre de 1967 y concordantes (15).

Por último, la Ley 15.838 del 14 de octubre de 1986 dispone en su art. 1 "Se exceptúan de los cometidos asignados al INAC por el Decreto-Ley 15.605 del 27-7-84, aquellos que tienen relación directa con el control de instalación y funcionamiento de carnicerías en todo el territorio nacional, excepto en el departamento de Montevideo.

Artículo 2. El control de instalación y funcionamiento referido precedentemente será ejercido por las respectivas Intendencias Municipales a quienes compete además otorgar las habilitaciones".

Repasando las actas del poder legislativo (11) en cuanto se refiere a la discusión parlamentaria del anteproyecto de Ley (luego Ley 15.838) presentado por 23 Diputados (todos del interior), aprobado por unanimidad en la comisión y por 47 en 48 el proyecto en general; extractamos parte de los fundamentos dados en sala por los Señores Representantes Nacionales:

Sr. Diputado: "... no sólo porque es de estricta justicia con relación a los Municipios, sino también porque significa el respeto a la Constitución de la República y a la Ley Orgánica.

Nuestra Constitución, a través de su artículo 262, establece que el gobierno y la administración de los Departamentos serán ejercidos por la Junta Departamental y el Intendente, excepto en lo que respecta a los servicios de seguridad pública.

Entendemos que estas disposiciones son lesivas de la autonomía municipal e inconstitucionales, porque contradicen la letra y el espíritu del artículo 262 de la Constitución y la ley Orgánica Municipal. Consideramos, también, que con el proyecto que estamos tratando se restablezca para las Intendencias del Interior la debida autonomía y se les asigne nuevamente el control de instalación, habilitación y funcionamiento de carnicerías, que siempre cumplieron con eficiencia".

Sr. Diputado: "... Por otro lado, creemos que el verdadero control que debe efectuarse en cuanto a la calidad de los productos allí comercializados, a la higiene del local, etc, sin ningún lugar a dudas es atributo de las Intendencias Municipales, dado que por sus propias condiciones están en contacto permanente con la problemática departamental".

Sr. Diputado: "... En cuanto al segundo problema, que tiene que ver con la higiene de la carne, está mejor controlada por las Intendencias, que actúan en el departamento, y no por INAC que manda sus inspectores cada tanto tiempo, como es natural que así sea, pues no puede tener uno en cada departamento".

Sr. Diputado: "... Es evidente que el control de instalación y funcionamiento de las carnicerías es una facultad netamente municipal. Todos los Municipios, a través de sus respectivas direcciones de bromatología, poseen los medios para hacerlo".

Esta lucha de a quien compete el control higiénico-sanitario de las carnicerías no es nueva y como ejemplo nos remitimos a transcribir lo dispuesto en el literal a y b) del art. 2 del Decreto 661/77 del 28 de noviembre de 1977:

"a) Por la Dirección de Industria Animal del Ministerio de Agricultura y Pesca en todo lo relacionado con la higiene y sanidad de la materia prima y de los medios y procedimientos tecnológicos a utilizarse de modo de asegurar la obtención de un producto adecuado en todas las etapas de su industrialización desde el punto de vista higiénico-sanitario y apto para el consumo al que está destinado..."

Antes de finalizar queremos hacer notar dos cosas:

1.- Que nada dice el Decreto 369/83 del 7 de octubre de 1983 (14), Reglamento oficial de Inspección Veterinaria de Productos de Origen Animal, con referencia a carnicerías y el estado higiénico de venta de la carne.

2.- A pesar de estar derogado el art. 35, núm. 24. inc. F, G, H, de la Ley 9515 por el Decreto-Ley 14810 la Intendencia de Canelones por Resolución (14) 4.510/83 de la Junta de Vecinos de Canelones, legisla en el capítulo

"De la carne"... " quedando prohibida la tenencia o expendio de carnes picadas con anterioridad..."

Dicha norma a similitud del Decreto 16797/75 de Montevideo es conocida como Ordenanza Municipal de Bromatología.

Aquí es claro que la normativa esta dada como protección al consumidor, por los riesgos de una falta de higiene de las maquinarias y las malas condiciones de conservación que representan las carnes cuando son tan finamente trozadas en las carnicerías con mucha antelación a su venta.

RESULTADOS

De la investigación de la

normativa resulta que:

1.- De acuerdo a la legislación vigente existe un tratamiento del tema diferente para Montevideo que para el resto del país. Discriminación ésta que fue en su momento fundamentada en la defensa de la Constitución y la autonomía Municipal.

La pregunta queda planteada. ¿A los ciudadanos de Montevideo los rige una Constitución y una Ley Orgánica diferente a los del resto del país?.

La respuesta es obvia.

2.- Según la normativa actual esta vedada la actuación de los controles higiénicos-sanitarios a la Intendencia de Montevideo en lo que respecta a carnicerías por haber sido derogado el art.

35 de la Ley 9515.

3.- Primero CADA, luego INACHan tenido la oportunidad suficiente desde el punto de vista legislativo para hacer cumplir sus cometidos.

4.- Desde siempre el MGAP ha ejercido la función en el control de los aspectos higiénicos-sanitarios y lo hace actualmente en las plantas de faena, además si bien en algunos momentos el MGAP se ha alejado (como en la actualidad) de realizar dichos controles, nunca perdió sus facultades.

5.- Queda claro que INAC es el organismo rector en cuanto a definir una política nacional de carne.



**La pequeña dosis
de
grandes resultados**

Fostamisol®

ANTIHELMINTICO INYECTABLE
FOSFATO DE LEVAMISOL AL 22,3%



Instituto
San Jorge
Bagó S.A.

L
U
1

LABORATORIO URUGUAY
J.J. DESSALINES 1831-35 TEL. 69 29 45
MONTEVIDEO URUGUAY.

C. AUGSBURGER

COMENTARIO FINAL

Se ha cometido discriminación con los consumidores de Montevideo que sería bueno revertir, ya que aquel fundamento de que "... la concentración de funcionarios de INAC en Montevideo..." llevaría a un mejor control, no ha dado el resultado esperado.

Al menos desde 1986 a la fecha la situación sigue incambiada, aumentando los perjuicios para el consumidor.

La Intendencia Municipal de Montevideo no puede controlar la higiene de las carnicerías, INAC no lo hace y el MGAP tampoco lo realiza aparentemente por no entrar en una lucha de competencias o por falta de infraestructura ya que como hemos visto cuando el Poder Ejecutivo tuvo que definir posiciones lo hizo a favor de este organismo.

Parece difícil de creer pero en el interior de la República donde aparentemente la situación normativa esta clara con respecto a competencias la situación en cuanto a presentación del producto y conservación son las mismas que en Montevideo.

Esto lleva a pensar que algún organismo tipo el MGAP con jurisdicción nacio-

nal debería encarar un programa de educación higiénico-sanitaria, quizás apoyado por el Ministerio de Salud y el de Educación.

BIBLIOGRAFIA

1. Decreto 482/78: Se aprueba la reglamentación sobre habilitación y funcionamiento de carnicerías en todo el territorio nacional.

2. Junger Sinell, H. Introducción a la Higiene de los Alimentos. Ed. Acribia, 1981.

3. Pérez Sánchez, R. Casaux, Brum. Legislación alimentaria en el Uruguay. Rev. Alimentaria 196, 1988. España.

4. Decreto-Ley 14810 del 11-8-78.

Se establecen normas sobre comercialización en el mercado interno.

5. Decreto 482/78 del 18-8-78.

Se aprueba la reglamentación sobre habilitación y funcionamiento de carnicerías en todo el territorio nacional.

6. Ley 9515: Ley Orgánica Municipal.

7. Decreto 458/78 del 11 de agosto de 1978.

Se fijan normas sobre

abasto de todo el territorio de la República.

8. Decreto 459/78 del 11 de agosto de 1978.

Se permite la libre instalación de plantas de faena e industrialización de carnes.

9. Decreto-Ley 15605 del 27 de julio de 1984.

Se crea el INAC y se establecen sus cometidos.

10. Ley 15838 del 14 de noviembre de 1986.

Se exceptúan de los cometidos asignados al INAC del control de instalación y funcionamiento de carnicerías en todo el territorio nacional excepto en el Depto. de Montevideo.

11. Actas cámaras de representante del 16 de setiembre de 1986 pp 203-208.

12. Decretos 661/77 del 28 de noviembre de 1977.

Se delimitan las competencias entre la Dirección General de los Servicios Veterinarios e INAC.

13. Decreto 369/83 del 7 de octubre de 1983.

Reglamento oficial de Inspección Veterinaria de productos de origen animal.

14. Ordenanza Bromatológica de Canelones.

Resolución de la Junta de Vecinos de Canelones 4510/83.

15. Casaux, G. El Instituto Nacional de Carnes. FCU-1987.