



Aplicaciones
nucleares
para una **REGIÓN**
sustentable

**Segunda Reunión de Coordinación del Proyecto Regional
RLA5075 "Fortalecimiento de la capacidad regional en materia de prevención y control
progresivo del gusano barrenador de ganado"**

Informe sobre avances en los muestreos de GBG para secuenciación genética (Argentina, Uruguay y Brasil)

Medellín, Colombia, 25 a 29 de Noviembre 2019

Jorge Caetano Junior

Coordinador General de Sanidad Animal

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento - Brasil

Outputs del Proyecto – Manuales de procedimientos para el monitoreo y control del GBG



ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA (OIEA)

**Protocolo de colecta del gusano barrenador del ganado
Cochliomyia hominivorax, Coquerel, para el estudio de la
estructuración geográfica de sus poblaciones en América del Sur y
la inferencia de su dispersión a través de la estimación del flujo
génico**

Proyecto de Cooperación Técnica RLA/5/075

*Fortalecimiento de las Capacidades Regionales en la Prevención y Control Progresivo del Gusano
Barrenador del Ganado (GBG)*

Septiembre 2018



PROYECTO FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES PARA LA EVALUACIÓN DE LA
FACTIBILIDAD DE UN PROGRAMA DE CONTROL PROGRESIVO DEL GBG

OIEA/RLA/5/075

PROPUESTA DE UN PLAN ESTRATÉGICO SUBREGIONAL PARA LA ERRADICACIÓN DEL
GUSANO BARRENADOR DEL GANADO *Cochliomyia hominivorax* EN AMÉRICA DEL SUR

Elaborado por

Moisés Vargas Terán¹

Gerardo Ortiz Moreno²

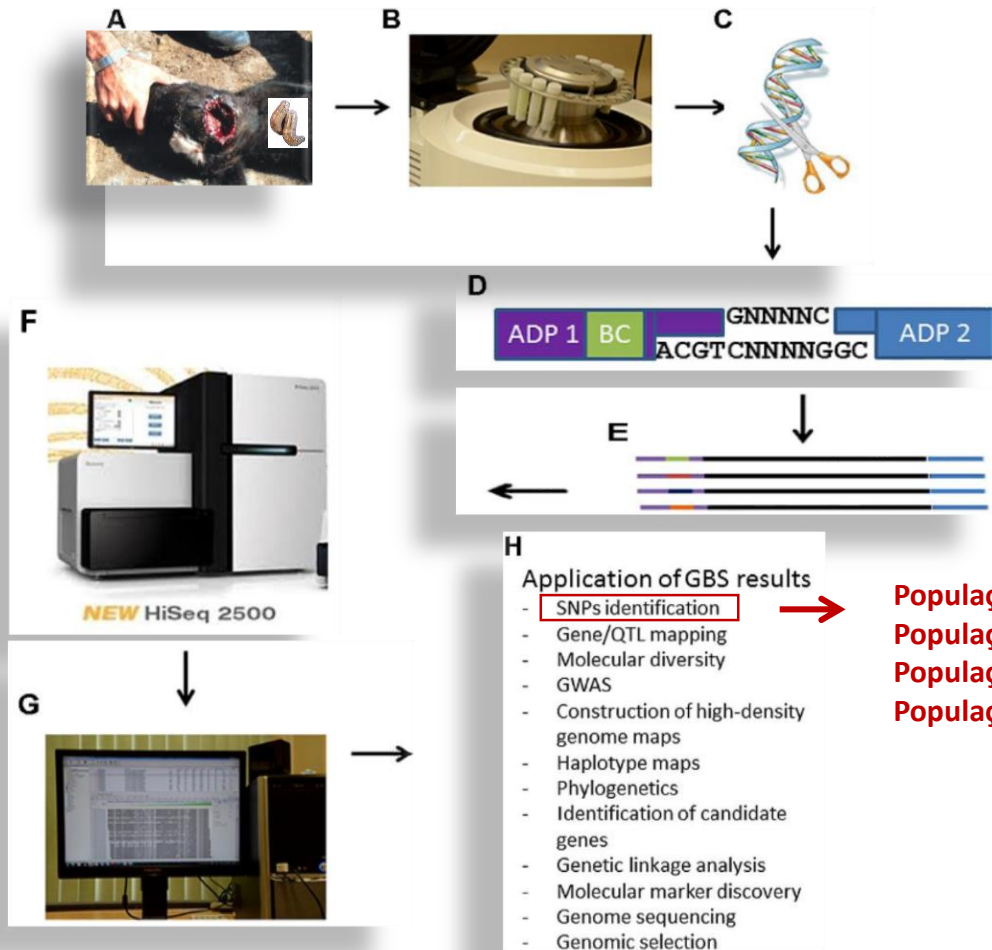
Viena, Austria, septiembre 2018

¹ Especialista Internacional de Salud Animal.

² Especialista en Proyectos Empleando Insectos Estériles.



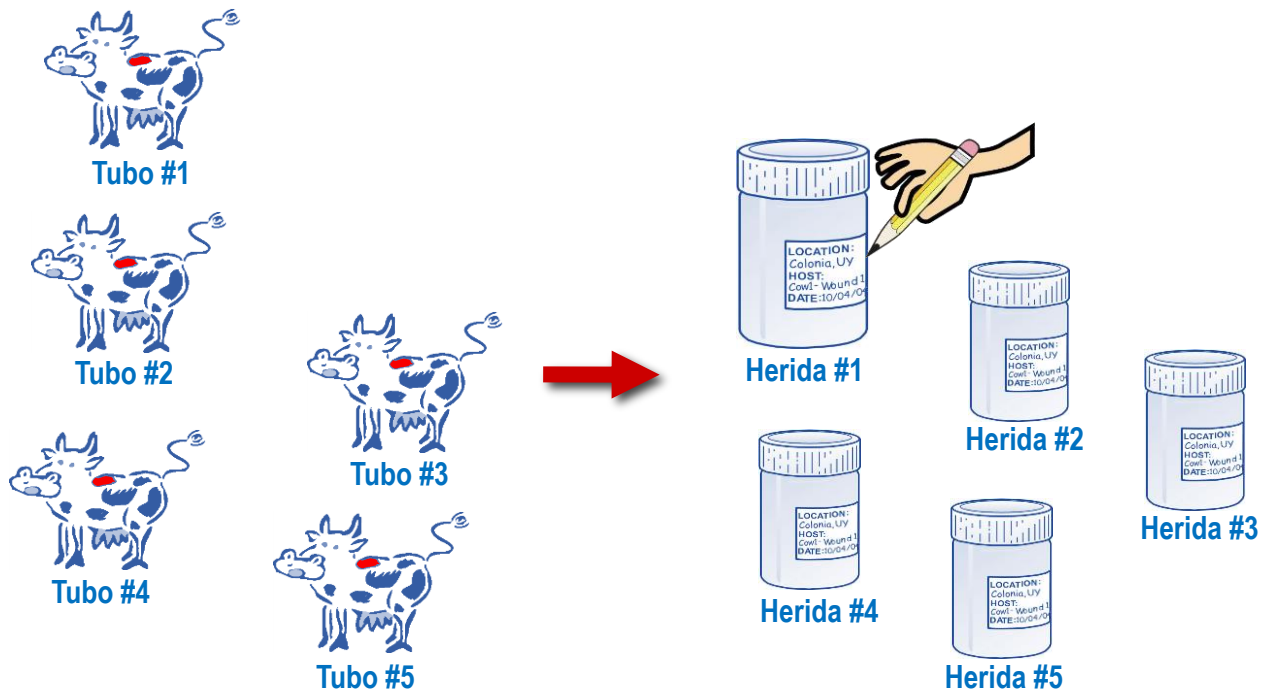
Método GBS: Genotipaje por secuenciación



1. Recolección
2. Procesamiento de las muestras
3. Extracción del DNA
4. Cuantificación del DNA
5. Secuenciación del DNA
6. Análisis de los resultados y reportes

Obtención de las muestras

Recolección de larvas de *C. hominivorax*



Obtención de las muestras

- En cada sitio de reproducción, recolecte larvas de 20 a 30 miasis (extraiga hasta 10 larvas "grandes" (en la etapa L3) de cada miasis (herida) con pinza veterinaria.
- Coloque las larvas de cada miasis en un recipiente que contenga etanol absoluto (95-100%) e identifíquelo, agite el recipiente para separar los tejidos del huésped.
- La larva de cada miasis debe colocarse en un solo recipiente identificado (1 herida = 1 recipiente)
- En un papel, escribir con lápiz común el código de la muestra, localidad (municipio, estado/departamento, país, fecha, hospedero y nombre del colector. Además, en una hoja que acompañe a los recipientes incluir toda la información detallada y observaciones consideradas pertinentes. Se recomienda que el código de la muestra se haga con el país, la localidad de muestreo y el número de la muestra. Por ejemplo, muestra 1 de Bañado de Media, Uruguay, será UyBdeM01.

Obtención de las muestras

Observaciones: CUIDADOS en la recolección de las muestras de larvas de GBG



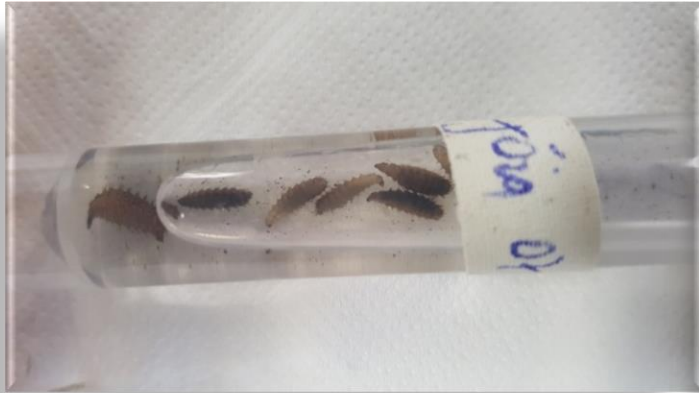
Evitar contaminación con carne y sangre de la herida (miásis)



Evitar Larvas presionadas

Obtención de las muestras

OBSERVAÇÕES: Contaminación en la recolección de muestras de larvas del GBG



Chrysomia albiceps (Blowflies) (*miasis ovinos*)

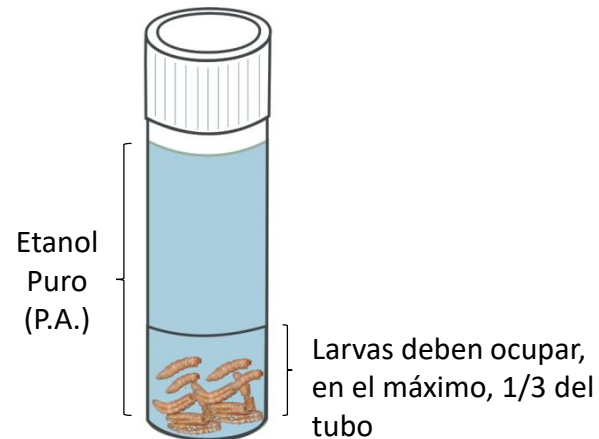


Dermatobia hominis (mosca do berne) em miasis de bovinos

Obtención de las muestras

Consejos para la conservación de larvas recolectadas

- Las larvas deben ocupar un máximo de 1/3 del tubo como se muestra en la figura. Esta relación es importante para garantizar la fijación del tejido, evitando la degradación.
- El tubo debe completarse con etanol puro (P.A) y mezclarse invirtiendo varias veces para permitir que todas las larvas entren en contacto con el etanol de manera uniforme.
- Deseche la explosión y / o las larvas perforadas. Esto evita la contaminación de las otras larvas en el tubo.
- Etiqueta con lápiz dentro y fuera del tubo
- Enviar formulario de recolección por separado (sin pegarse al tubo de empaque)



Extração de DNA (Doyle & Doyle, 1987, adaptado)

1. Utilizar por volta de 25-80 mg de material. As amostras serão trituradas em microtubos Eppendorf de 2,0 ml usando um pistilo (acoplado em mini-homogenizador, a bateria), em 200µl de tampão de extração¹.
2. Acrescentar 600µl do tampão de extração¹ para chegar aos 800 µl.
3. Acrescentar 12-15µl de Proteínase K (20 mg/mL).
4. Misturar as amostras em vortex (~1 minuto), e colocá-los em banho-maria a 65°C por 60 minutos (*misturar, por inversão, a cada 10 minutos*).
5. Adicionar igual volume (800µl) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturar, em vortex, até formar uma emulsão.
6. Centrifugar a solução por 10 minutos a 13000 rpm (centrífuga a 4°C).
7. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo, com cuidado para não pipetar a interfase. Se o volume da fase superior não for superior à fase intermediária com fragmentos de tecido, adicionar mais tampão, misturar vigorosamente e re-centrifugar.

Neste passo, tratar com RNase A (10 mg/mL) – 4-12µl por 15 minutos a 37°C (agitando a cada 5 minutos)

8. Adicionar 200µl por tubo do tampão de extração sem proteinase K e β-mercaptoetanol, e 800µl (igual volume) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando até formar uma emulsão.
9. Centrifugar a solução por 10 minutos a 13000 rpm (centrífuga a 4°C).
10. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo, com cuidado para não pipetar a interfase.
11. Repetir esses três passos anteriores (8, 9 e 10) mais uma vez.
12. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo. Adicionar 1 volume igual (800µl) de isopropanol gelado e misturar vertendo o tubo algumas vezes. Deixar a -20°C por pelo menos 1 hora – Faça por 3 horas. (*melhor overnight*)
13. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm (centrífuga a 4°C).
14. Lavar o pellet com 1ml de Etanol 70% para remover sais por duas vezes, e secar ao ar ou sob vácuo num dessecador.
15. Resuspender o DNA em 30-40µl de tampão 1xTE. Manter a amostra a -20°C.
16. Deixar para ler no Nanodrop ou para correr um gel de verificação para o dia seguinte da extração.

1- Tampão de Extração (para 100 ml)

	Quant.	Conc. final
- CTAB	2 g	2 %
- NaCl 5 M	28 ml	1,4 M
- Tris HCl pH 8,0 1 M	10 ml	100 mM
- EDTA pH 8,0 0,5 M	4 ml	20 mM
- Polivinilpirrolidona (PVP-40)	1 g	1 %

1xTE: - 10mM Tris.Cl (pH 7,4)
- 0,1mM EDTA (pH 8,0)

Quantidades p/ 100ml:

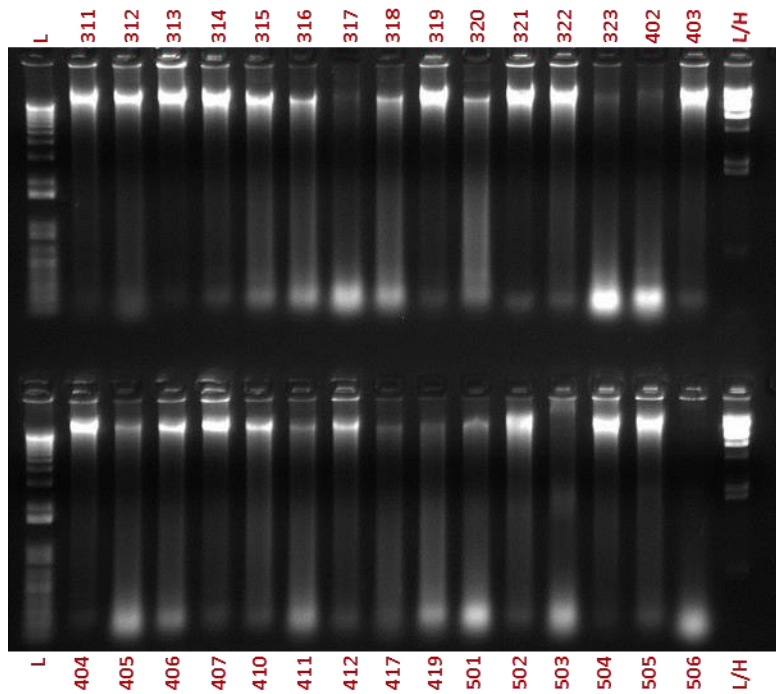
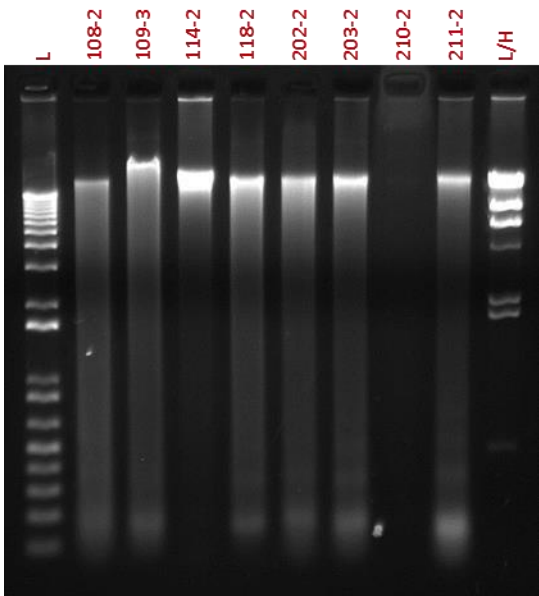
Tris.Cl 1M	-	1ml
EDTA 0,5M	-	20µl
H ₂ O q.s.p.	-	100ml

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide
(Brometo de cetiltrimetilamônio)

Adaptado para la *C. hominivorax* en el Laboratorio del LabGEA/ CBMEG/ UNICAMP

Extracción del DNA

Geles de extracción de DNA – Muestras de Uruguay



Muestras de larvas de GBG ya recolectadas



Poblaciones Uruguay: 511 muestras



Poblaciones Argentina: 229 muestras



Poblaciones Rio Grande do Sul (Brasil): 35 muestras

Muestras de larvas de GBG ya procesadas

País	No. de poblaciones	No. de Muestras (heridas)	No. de muestras de DNA Extraído
Brasil (RS)	6	35	35
Uruguay*	21	511	356
Argentina	7	229	20
Total	34	775	411

(*) término previsto de cierre del procesamiento por la Unicamp (Brasil) de las 155 muestras restantes de Uruguay: próxima semana.

Muestras de larvas de GBG ya procesadas



Ventajas de concluir la etapa de extracción del DNA:

Mejores condiciones de conservación, con menos posibilidades de pérdidas

Muestras de larvas de GBG ya procesadas




Ventajas de concluir la etapa de cuantificación del DNA:

Mejores condiciones de economicidad, al conocer si el conjunto de muestras tienen la cantidad mínima de DNA para el éxito de la secuenciación

Adquisición de materiales para continuidad de la extracción

- Adquisiciones públicas – procedimientos licitatorios
- Unidades involucradas: LFDA-SP y LFDA-MG (MAPA)
- Modalidad de licitación: técnica y precio (más larga en el tiempo)
- Recursos identificados
- Procesos licitatorios iniciados o cerca del inicio
- Meta de conclusión: Diciembre


 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
 COORDENAÇÃO GERAL DE SANIDADE ANIMAL - CGSA
 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Bairro Zona Cívico-Administrativa - DF, CEP.: 70.043-900
 Tel: (61) 3218-2148 - <http://www.agricultura.gov.br>

INFORMAÇÃO Nº 21/CGSA/DSAIP_2/SDA/MAPA
PROCESSO Nº 21000.076569/2019-34

INTERESSADO(A): CGSA/DSA
Assunto: Justificativa para aquisição de insumos voltados à extração de DNA de C. hominivorax em colaboração com a Unicamp, e em apoio ao Projeto AIEA 5075.

A mosca da bicheira, conhecida pelos países de língua hispânica como "gusano barrenador del ganado" e pelos de língua inglesa como "New World Screw worm", é uma doença listada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e classificada como doença transfronteiriça pela própria OIE e pela FAO.

No Brasil, a miíase produzida pelas larvas da mosca da bicheira é classificada pela Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013, como doença de notificação obrigatória mensal ao serviço veterinário oficial.

O Brasil participa, juntamente com outros 15 países das Américas (Argentina, Belize, Bolívia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai e Uruguai), do Projeto RLA 5/075 da Agência Internacional de Energia Atômica intitulado "Fortalecimento das Capacidades Regionais para a Prevenção e o Controle Progressivo da Mosca da Bicheira", iniciado em 1º de janeiro de 2018 e com término previsto para 31 de dezembro de 2020. Antes dele, o assunto foi abordado pelo Projeto RLA 5/067, desenvolvido no período de 2014 a 2017 que tinha por objetivo o apoio à geração de capacidades para avaliação da factibilidade de um programa de controle progressivo da mosca da bicheira na América do Sul e Caribe.

A mosca da bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) é considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), como uma doença transfronteiriça que afeta animais e seres humanos. Essa doença afeta significativamente a produção animal e o comércio dos países da América Latina e do Caribe, colocando em risco não apenas a produção e a segurança alimentar, mas também afetando a saúde pública e gerando perda de biodiversidade.

Todos esses aspectos são abordados na Agenda 2030 das Nações Unidas e incluídos nos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. A mosca da bicheira foi erradicada do sul dos Estados Unidos ao Panamá, usando a técnica de insetos estérteis (TE). Essa técnica é baseada na redução da prevalência da mosca a partir da dispersão de machos esterilizados por irradiação gama, daí o envolvimento da AIEA com o tema. A erradicação da mosca desde o sul dos Estados Unidos até a Província de Darien no Panamá foi alcançada através da implementação de programas regionais progressivos utilizando a TE, iniciados na década de 60 e finalizados em 2006 com a declaração do Panamá como país livre.

A COPEG contribui com a instalação de criação em massa que produz a mosca da bicheira estértil e também com instalações que incluem equipamentos, equipamentos de escritório, laboratórios e especialistas. Em cada país participante, existe uma Organização Nacional de Saúde Animal, reconhecida pela organização internacional por epizootias para realizar atividades relacionadas ao controle de pragas e doenças animais. Em cada Organização Nacional, há um ente oficial atuando como contraparte. As Organizações Nacionais possuem equipamentos e

o ao
 ies de
 m caso de
) controle

taxas de
 o econômico
) afeta
 istudo recente
 le US\$ 49 a
 estimados

bicheira na
) pelos

técnica de
) a
) relação

2021,
 te o período
 de fortalecer
 no objetivo
 os
 rica do Sul,
 rogressivo
 é fundamental
 países da

na
 scendo os

junto
 países,
 m esforço
 roveniente

a praga. A
 ão e
 competem
 ribuem para

lades dos
 le
 a do Sul e
 ecidas e o
 banho

é essencial
 espaço
 de cada
 grações,

fica de
 ndivíduos ou
 bsidiando a

)
 ecessita

na extração
 om o
 bsidiaria

turação

is in Brazil - Braz.

(a) Geral, em
 t. 6°, 5 1°, do

licador

SEI nº 8886495

Informação 21 (8886495) SEI 21000.076569/2019-34 / pg. 1

Informação 21 (8886495) SEI 21000.076569/2019-34 / pg. 2

Informação 21 (8886495) SEI 21000.076569/2019-34 / pg. 3

