### UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

### FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

## "ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE Trypanosoma evansi EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS"

Realizado por:

CAMILA BELÉN CHÁVEZ PROAÑO

Director del proyecto:

Dr. José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 07 de marzo del 2022

### DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, CAMILA BELÉN CHÁVEZ PROAÑO, con cédula de identidad #171705276-3, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

FIRMA 171705276-3

### **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

## "ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE Trypanosoma evansi EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS"

Realizado por:

### CAMILA BELÉN CHÁVEZ PROAÑO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

### JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

Jone (1)

### **FIRMA**

### LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

### JUAN CARLOS NAVARRO LINO ARISQUETA

Después de revisar el trabajo presentado, lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador

FIRMA

Quito, 07 de marzo del 2022

### **DEDICATORIA**

El presente trabajo le dedico a mis padres por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más. También por todo el apoyo, esfuerzo y sacrificio que me han brindado durante toda mi carrera.

A Dios, quien en todo momento ha estado conmigo, y me dio fortaleza y sabiduría para culminar mi carrera.

A mi abuelita, Esperancita, quien es mi segunda madre y quien siempre me ha brindado su apoyo y cariño incondicional.

A mi hermana, Anllita, que me ha apoyado siempre, al igual que ha estado conmigo brindándome sus ánimos y consejos en cada circunstancia de mi vida.

A mi novio, Sebas, por todo su amor y apoyo en cada momento, y por ser una parte importante y fundamental en mi vida.

### **AGRADECIMIENTO**

A Dios por guiar cada uno de mis pasos y cumplir este sueño de culminar mi carrera.

A mis padres por apoyarme siempre en cada decisión y proyecto, y que gracias a ellos he logrado concluir con éxito mi carrera.

A mi tutor, José Rubén Ramírez, por permitirme ser partícipe de uno de sus proyectos dentro de la Universidad, y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Gustavo Guayaquil, por su apoyo y amistad incondicional durante toda mi carrera, al igual que todos los buenos y malos momentos compartidos.

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

### **SALUD GLOBAL**

Y con el financiamiento de

Proyecto "Enfermedades desatendidas, emergentes, epidemiología y biodiversidad"

### A cargo de

Dr. Juan Carlos Navarro, Ph.D.

Dr. José Rubén Ramírez, Ph.D.

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-P011617 2

07/03/2022 23:25:33

Para someter a:

To be submitted:

# ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE Trypanosoma evansi EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS

Camila Chávez<sup>1</sup>, Juan Carlos Navarro<sup>1</sup>, José Rubén Ramírez Iglesias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Internacional Sek, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador 7/03/2022 23:25:33

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: José Rubén Ramírez Iglesias PhD, Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-986391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Detección de *Trypanosoma spp.* en la provincia de Sucumbíos.

### **RESUMEN**

La tripanosomosis del ganado es una enfermedad hemoparasitaria de distribución mundial causada por tres protozoos flagelados del subgénero Trypanozoon (T. brucei, T. evansi, T. equiperdum) y una especie perteneciente al subgénero Dutonella (T. vivax), las cuales tienen un impacto socioeconómico significativo, y limitan la productividad del animal en todo el mundo. En América del Sur, están presentes solamente las especies de T. evansi, T. equiperdum y T. vivax, debido a que T. brucei es una especie endémica del África subsahariana, y su transmisión es a través de la picadura de moscas tsetsé pertenecientes al género Glossina spp. De esta manera, el control de la enfermedad depende en gran medida, de una detección correcta y un tratamiento eficaz para prevenir la propagación de este parásito. Pese a que el Ecuador se encuentra en una región donde la tripanosomosis presenta un carácter endémico y amplia distribución, son pocos los estudios que se han realizado respecto a la situación e información epidemiológica acerca de esta patología. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de tripanosomosis causada por T. evansi en animales de interés pecuario pertenecientes a la provincia de Sucumbíos, a través de la implementación de técnicas moleculares como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Para ello, se llevó a cabo la estandarización del ensayo LAMP mediante el uso de un indicador metálico conocido como azul de hidroxinaftol (HNB), debido a la reducción de riesgos de contaminación y la detección de ADN con un alto rendimiento. La detección molecular se realizó mediante las técnicas de PCR y LAMP empleando los primers RoTat 1.2 VSG específicos para T. evansi y adicionalmente en la técnica de PCR se empleó un conjunto de primers ESAG 6/7 específicos para el subgénero Trypanozoon. Posteriormente, se evaluaron 19 muestras de distintos "ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE

Trypanosoma evansi EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS"

animales de interés pecuario pertenecientes a la región Oriente del Ecuador. La prevalencia general

obtenida en la provincia de Sucumbíos mediante PCR ESAG 6/7 y PCR RoTat 1.2 fue del 15.78%

y 5.26%, respectivamente. Mientras que con el ensayo LAMP se obtuvo una prevalencia general

del 10.52% para T. evansi. La prevalencia encontrada en la provincia de Sucumbíos, indica la

posible presencia del agente infeccioso en poblaciones de animales de interés pecuario, lo que

representa un riesgo potencial para los animales presentes en el oriente del país. Por lo tanto, se

debe destacar la importancia de implementar técnicas sensibles, rápidas y específicas que puedan

adaptarse fácilmente a cualquier entorno, y de este modo proporcionar datos preliminares acerca

de esta patología en el Ecuador, ya que al obtener una detección adecuada acerca de esta

enfermedad se pueden tomar las medidas de control necesarias para la prevención y mitigación de

la tripanosomosis.

**Palabras clave:** LAMP, PCR, prevalencia, tripanosomosis, *Trypanozoon*, *Trypanosoma spp*.

3

### **ABSTRACT**

Cattle trypanosomosis is a hemoparasitic disease with worldwide distribution caused by three flagellate protozoa of the subgenus Trypanozoon (T. brucei, T. evansi, T. equiperdum) and one species belonging to the subgenus *Dutonella* (*T. vivax*), which have an impact socioeconomically significant, and limit animal productivity worldwide. In South America, only the species of T. evansi, T. equiperdum and T. vivax are present, since T. brucei is an endemic species of sub-Saharan Africa, and its transmission is through the bite of tsetse flies belonging to the genus *Glossina spp*. In this way, disease control depends largely on correct detection and effective treatment to prevent the spread of this parasite. Despite the fact that Ecuador is located in a region where trypanosomosis is endemic and widely distributed, few studies have been carried out regarding the situation and epidemiological information about this pathology. Therefore, the objective of this study was to determine the prevalence of trypanosomosis caused by T. evansi in animals of livestock interest belonging to the province of Sucumbios, through the implementation of molecular techniques such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP). For this, the standardization of the LAMP assay was carried out by using a metallic indicator known as hydroxynaphthol blue (HNB), due to the reduction of contamination risks and the detection of DNA with a high yield. Molecular detection was performed by PCR and LAMP techniques using the RoTat 1.2 VSG primers specific for T. evansi and additionally in the PCR technique was used a set of ESAG 6/7 primers specific for the subgenus Trypanozoon. Subsequently, 19 samples of different animals of livestock interest belonging to the eastern region of Ecuador were evaluated. The general prevalence obtained in the province of Sucumbios by PCR ESAG 6/7 and PCR RoTat 1.2 was 15.78% and 5.26%,

"ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE

Trypanosoma evansi EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS"

respectively. While with the LAMP assay a general prevalence of 10.52% was obtained for T.

evansi. The prevalence found in the province of Sucumbios, indicates the possible presence of the

infectious agent in populations of animals of livestock interest, which represents a potential risk

for the animals present in the east of the country. Therefore, the importance of implementing

sensitive, fast and specific techniques that can be easily adapted to any environment should be

highlighted, and thus provide preliminary data about this pathology in Ecuador, since by obtaining

an adequate detection about this disease, the necessary control measures can be taken for the

prevention and mitigation of trypanosomosis.

**Keywords:** LAMP, PCR, prevalence, trypanosomosis, *Trypanozoon*, *Trypanosoma spp*.

5

### 1. INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis se considera una enfermedad infecciosa causada por diversos protozoarios hemoflagelados pertenecientes al género *Trypanosoma*, en donde distintas especies son capaces de infectar varios vertebrados incluidos equinos, ovinos, bovinos, y ciertos rumiantes (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999; Ramírez-Iglesias et al., 2017). Esta enfermedad presenta una alta prevalencia y distribución en las regiones tropicales y subtropicales del norte de África, el sudeste de Asia, así como en América Central y del Sur ocasionando importantes pérdidas económicas y una productividad animal limitada en todo el mundo (Desquesnes et al., 2013; Sánchez et al., 2015).

Los agentes causales de esta enfermedad en América Latina son *Trypanosoma vivax*, responsable principal de la tripanosomosis en bovinos, incluyendo a búfalos, caprinos y ovinos; *Trypanosoma evansi* causante de la tripanosomosis en caballos y camellos, además de afectar una amplia variedad de mamíferos, y *Trypanosoma equiperdum* causante de la tripanosomosis en equinos (Desquesnes, 2004). Según la localización geográfica y dependiendo de la capacidad patógena del agente infeccioso, a la tripanosomosis se le han asignado distintas denominaciones. En primer lugar, se tiene a la enfermedad causada por *T. vivax* conocida como "Huequera" que se transmite mecánicamente por picaduras de insectos tales como *Tabanus spp.* y *Stomoxys spp.*, en segundo lugar, se tiene a la enfermedad causada por *T. evansi* conocida como "Surra, Derrengadera o mal de caderas" que de igual manera se transmite por dípteros hematófagos (*Tabanus spp.* y *Stomoxys spp.*) afectando principalmente a caballos y camellos. Por último, se tiene a la enfermedad causada por *T. equiperdum* conocida como "Durina o mal du coit", la cual es una

enfermedad distintiva que afecta solamente a los équidos y se transmite principalmente a través del coito (Desquesnes, 2004; Desquesnes et al., 2013).

La enfermedad puede ir desde un estado agudo a un estado crónico de larga duración en los animales infectados con Trypanosoma spp. Dentro de los signos clínicos comunes que se presentan en la mayoría de las especies hospedadoras, se incluyen: anemia progresiva, fiebre intermitente, disminución de la productividad, pérdida de peso, alteraciones en el ciclo reproductivo, crías con bajo peso, infección transplacentaria, desorden hormonal y abortos espontáneos (Ramírez-Iglesias et al., 2011; Desquesnes et al., 2013). De la misma manera, se tiene que durante el transcurso de la enfermedad el animal puede presentar tres fases: la fase prepatente en el cual no se muestran signos clínicos, ya que es la fase de infección parasitaria (Osório et al., 2008), la fase aguda que se caracteriza por presentar persistencia de varias semanas, y por mostrar altos signos de fiebre, anemia, parasitemia, y pérdida de peso. Por último, se tiene la fase crónica en la cual la parasitemia disminuye, y el animal no muestra signos clínicos con la particularidad de que la anemia permanece en la mayoría de los casos, pues el parásito continua en el hospedador (Desquesnes, 2004). Sin embargo, cabe destacar que no existe ningún signo clínico diagnóstico, ni una lesión patognomónica específica relacionada a la infección por tripanosoma en el ganado, lo que hace que su diagnóstico clínico sea una tarea difícil (Desquesnes et al., 2013).

Existen distintos métodos de detección del patógeno que se han desarrollado para el diagnóstico de la enfermedad en varios de los animales infectados, entre ellas se tiene que una de las técnicas parasitológicas estándar más usadas es la microscopía, debido a que es una de las pruebas más asequibles y disponibles en el campo (Laohasinnarong et al., 2011). No obstante, en

varias ocasiones esta técnica suele presentar baja sensibilidad debido a la parasitemia fluctuante encontrada en animales infectados de forma natural (Desquesnes, 2004). De la misma manera, la detección de la tripanosomosis ha ido mejorando a través del desarrollo y el uso de herramientas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la técnica de "Reacción en Cadena de la Polimerasa" o comúnmente conocida como la PCR. Esta técnica, a diferencia de la microscopía, presenta una mayor sensibilidad y especificidad para la detección molecular. Sin embargo, los costos elevados, asociados a equipos e infraestructura, y la necesidad de contar con un personal altamente calificado, son los principales obstáculos para la aplicación de esta técnica (Kumar et al., 2021; Tong et al., 2018).

La detección de *Trypanosoma spp.*, lo cual sustenta el diagnóstico de la tripanosomosis, depende en gran medida de un ensayo sensible y preciso, principalmente en áreas con animales que presentan bajas parasitemias, puesto que a medida que disminuye la prevalencia de tripanosomosis, los nuevos métodos de detección necesitan tener una sensibilidad y especificidad mejorada, para así evitar la reaparición de la enfermedad ocasionada por brotes inesperados dentro del reservorio animal (Tong et al., 2018).

Un método alternativo para la detección molecular de tripanosomosis es la "Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle" o conocido por sus siglas como LAMP descrito por primera vez en el año 2000 (Notomi et al., 2000). Esta técnica posee varias ventajas frente a otros métodos, una de ellas es la capacidad que tiene para amplificar de manera rápida y específica secuencias de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas permitiendo la amplificación de unas pocas copias de ADN hasta 109 copias, en menos de 1 hora (Notomi et al., 2000), de tal modo que los amplicones

se pueden observar a simple vista o a través de la medición de fluorescencia o turbidez (Thekisoe et al., 2010). Otra de las ventajas importantes que posee esta técnica es su simplicidad al momento de realizarla, además de ser mucho más rápida y con costos relativamente bajos debido a que solo necesita de un dispositivo de calentamiento para la incubación, haciendo posible que se realice incluso en campo (Wong et al., 2017).

Debido a la simplicidad, bajos costos, y robustez que posee esta técnica, LAMP se puede aplicar sin la necesidad de utilizar termocicladores costosos para la detección de varias enfermedades infecciosas, ya que tiene la capacidad de ser utilizada como un ensayo; para la determinación de la prevalencia de tripanosomosis en animales de interés pecuario y otras enfermedades tales como: la malaria, tuberculosis, la enfermedad del sueño e incluso el COVID-19 (Sahoo et al., 2016, Dao Thi et al., 2020).

La tripanosomosis se ha extendido por varios países del continente incluyendo a Brasil, Venezuela, Colombia, Perú, Panamá (Desquesnes, 2004; Parra-Gimenez & Reyna-Bello, 2019), afectando negativamente las producciones ganaderas. Sin embargo, la tripanosomosis en Ecuador es considerada una enfermedad desatendida, puesto que esto se ve reflejado, en parte, en los pocos estudios que se han realizado, del mismo modo los estudios acerca de la prevalencia de esta enfermedad en su mayoría son limitados. Dentro de los pocos estudios acerca de esta enfermedad en Ecuador, se destaca al trabajo de seroprevalencia a nivel nacional reportado por Wells *et al.* (1977), a través de la prueba de inmunofluorescencia indirecta con el antígeno de *T. vivax*, convirtiéndose en el primer reporte de tripanosomosis animal en el país. En un segundo estudio realizado en tres provincias del oriente ecuatoriano (Napo, Orellana, y Sucumbíos) se reportó una

seroprevalencia general de tripanosomosis bovina del 16.82% utilizando la técnica de ELISAi (Hinojosa Castillo, 2021). Recientemente, se realizó por primera vez un estudio acerca de la identificación y caracterización de las especies de tripanosoma pertenecientes al brote de tripanosomosis bovina en la región costera del Ecuador (Chávez-Larrea et al., 2021). Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de tripanosomosis causada por *T. evansi* en animales de interés pecuario pertenecientes a la provincia de Sucumbíos, a través de la implementación de técnicas moleculares como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Estandarización de la prueba isotérmica

La técnica de LAMP fue estandarizada, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas que permitan una diferencia clara entre muestras positivas y negativas, así como la máxima sensibilidad y especificidad, a partir de los reactivos empleados. Para ello, se utilizó los aislados venezolanos de 3 *Trypanosoma spp.*, caracterizados molecularmente por Sánchez *et al.* (2015): TeAp-ElFrío01 y TeAP-Mantecal01, identificados como *T. evansi*, mientras que el aislado de TeAp-N/D1, clasificado como *T. equiperdum*, se utilizó para la evaluación de especificidad analítica del ensayo LAMP.

El ensayo de LAMP se llevó a cabo empleando los primers y parte de las condiciones descritas por Tong *et al.* (2018), junto con las recomendaciones de las casas comerciales de los reactivos empleados. Para el revelado colorimétrico, se utilizó azul de hidroxinaftol (HNB), un

reactivo que se caracteriza por ser un indicador de iones metálicos, y ampliamente utilizado debido a la reducción de riesgos de contaminación (Goto et al., 2009). De manera general, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μL, que contenía 6 primers para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG (Tabla 1). Las concentraciones para cada uno de los componentes fueron las siguientes: 0.2 μM de F3 y B3, 1.6 μM de FIP y BIP, 0.8 μM de LF y LB, 1.4 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.32 U/μL del fragmento de la ADN polimerasa *Bsm* (ThermoFisher Scientific), 1X Isothermal Amplification Buffer Pack (New England BioLabs®), y 1 μL de la muestra de ADN de campo o control positivo (TeAp-ElFrío01 o TeAP-Mantecal01).

Tabla 1: Secuencia de los primers específicos empleados en la técnica de LAMP

Primers	Sequences(5'-3')	
F	CAAAACTAACAGCCGTTGCAGCG	
R	AGTTCCGGTACCTTCTCCATTTC	
F3	GTAGGAAGCAACACCTGCG	
В3	TTGATTAGTGCTGCGTGTGT	
FIP	TGCGAGGTGCACCTTGATGTTGAAGCAATAACCGGCAACGAC	
BIP	GAAGGCAAAGTTGACGACCAGCTGTGGTGTGCTTTTCCTTGT	
LF	GCGATTTTGATCCCGCCG	
LB	CAGAACGAGCAGAATTTTCCA	

Para establecer las condiciones óptimas de LAMP, se evaluaron distintas temperaturas de reacción: 60, 62.5 y 65 °C por 30 minutos, con el fin de obtener el mejor rendimiento de la región a amplificar. Y posterior a esto, todas las mezclas de reacción se calentaron a 80 °C durante 10 minutos. A su vez, en la reacción se evaluaron las concentraciones de HNB sal trisódica (Baker Analyzed) y Mg<sup>2+</sup> (New Englands BioLabs®) con el fin de determinar el revelado óptimo de la reacción, empleando las siguientes condiciones: **Condición A**, 6 mM de Mg<sup>2+</sup> y 0.25 mM de HNB.

Condición B, 8 mM de Mg<sup>2+</sup> y 0.25 mM de HNB. Condición C, 6 mM de Mg<sup>2+</sup> y 0.125 mM de HNB. Condición D, 8mM de Mg<sup>2+</sup> y 0.125 mM de HNB. Posterior a esto, se evaluó la sensibilidad analítica del ensayo LAMP utilizando 12 diluciones seriadas a partir de un producto de PCR que contenía el gen diana, con una cantidad de 1.10<sup>11</sup> copias de ADN por reacción, hasta llegar a la última dilución que fue 1 copia de ADN por reacción. El ADN se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit® 2.0 - Thermo Fisher Scientific, y los cálculos para la cuantificación del número de copias a partir de amplicones purificados del gen diana, se realizaron empleando el servidor en línea URI Genomics & Sequencing Center (https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html). Por último, se evaluó la especificidad analítica de LAMP con HNB, utilizando ADN genómico del aislado de *T. equiperdum* (TeAP-N/D1) como control negativo para la detección de *T. evansi*, además el producto LAMP se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

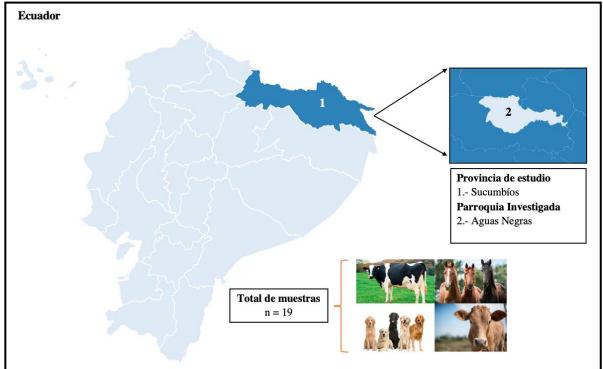
La positividad en las reacciones se estableció inicialmente a simple vista a través del cambio de coloración de violeta a azul cielo. El análisis del producto de amplificación asociado a las estructuras secundarias generadas por LAMP, se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (2ug/mL), durante 50 minutos a 100v. Una vez transcurrido el tiempo de corrida de las muestras, las bandas en el gel se visualizaron a través de un transiluminador UV.

### Detección molecular en muestras de campo

Las muestras empleadas en este estudio fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Zoonosis- CIZ de la Universidad Central del Ecuador pertenecientes al proyecto "Artrópodos". Se obtuvo un total de 19 muestras de diferentes especies, razas, sexo, grupo etario,

y localidad, pertenecientes a la provincia de Sucumbíos. Las muestras de campo provienen de la parroquia Aguas Negras (0°5′0″S, 76°53′0″W), a una altitud promedio de 1200 m.s.n.m, con una superficie total de 453.9684 km² respectivamente [Figura 1].

Figura 1: Localización geográfica del área de estudio en la provincia de Sucumbíos, parroquia Aguas Negras.



Para la detección molecular de las muestras de campo se emplearon dos ensayos de PCR, utilizando los primers ESAG 6/7 específicos para el subgénero *Trypanozoon* (Holland et al., 2001). Adicionalmente se empleó un par de primers dirigidos hacia el gen RoTat 1.2 VSG, específico para *T. evansi* (Tong et al., 2018).

Los ensayos de PCR por ESAG fueron realizados en una mezcla de reacción de 25 μL, la cual contenía 12.5 μL de Go Taq Master Mix (Promega<sup>Tm</sup>); una concentración de 0.5 μM para los primers ESAG 6/7 (F/R) (**Tabla 2**), y 1 μL del ADN purificado a partir de animales de interés

pecuario. El programa de ciclado fue desarrollado para generar las siguientes condiciones de reacción: un primer paso de desnaturalización por un período de 3 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de amplificación que consistían en 1 min de desnaturalización a 94°C, 40 seg a 54°C para la hibridación y 40 seg de polimerización a 72°C, con un período final de extensión de 3 min a 72 °C y un período de enfriamiento de 4°C. El proceso para amplificar exclusivamente el ADN de *T. evansi* fue similar al anterior, pero empleando una concentración de 2 μM del conjunto de los dos primers dirigidos hacia el gen RoTat 1.2 VSG (F/R) (Tabla 2), y una temperatura de hibridación de 53°C.

Tabla 2: Secuencia de primers RoTat 1.2 VSG (F/R) y ESAG 6/7 (F/R) utilizados en este estudio.

Primer	Secuencia	Referencia	
TonF	CAAAACTAACAGCCGTTGCAGCG	(Tong et al., 2018)	
TonR	AGTTCCGGTACCTTCTCCATTTC	(Tong et al., 2018)	
ESAGF 6/7	ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG	(Holland et al., 2001)	
ESAGR 6/7	CACGTGAATCCTCAATTTTGT	(Holland et al., 2001)	

El análisis de los productos amplificados se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, teñido con safe-view (1uL/mL), durante 1 hora a 100v. Una vez transcurrido el tiempo de corrida de las muestras, las bandas en el gel se visualizaron a través de un transiluminador UV.

### Determinación de prevalencia

El porcentaje de prevalencia que se obtuvo en este estudio mediante el ensayo de PCR y LAMP se calculó a través de la siguiente Ecuación (1).

 $Prevalencia = \frac{N\'umero\ de\ muestras\ positivas\ con\ la\ t\'ecnica}{Total\ de\ muestras\ analizadas\ con\ la\ t\'ecnica} \times 100\%\ (Ec.\ 1)$ 

### 3. RESULTADOS

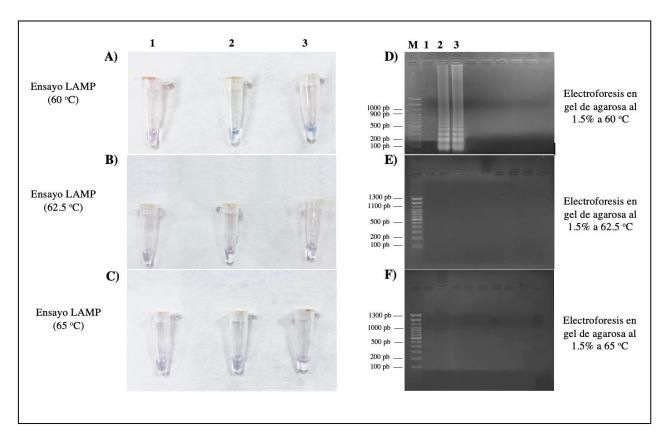
### Estandarización del ensayo LAMP

### **Gradiente de Temperatura**

Para los ensayos LAMP se utilizó ADN genómico de los aislados TeAp-ElFrío01 y TeAP-Mantecal01 correspondientes a *T. evansi*, con el fin de determinar la temperatura óptima de amplificación. Los ensayos de LAMP se realizaron con tres temperaturas distintas: 60, 62.5 y 65°C. En la [Figura 2A, B, C] se muestran los tres ensayos de LAMP, los cuales indicaron claramente que los ensayos realizados a 62.5 y 65°C provocaron la inhibición de la reacción, ya que no ocurrió ningún cambio de color significativo en los tubos de reacción [Figura 2B, C], y tampoco se observó la presencia de bandas en los geles de electroforesis [Figura 2E, F]. Sin embargo, el ensayo de LAMP realizado a 60°C mostró cambios de color significativos a simple vista, siendo el color violeta, el representativo de la muestra negativa; y el azul cielo; el representativo para las muestras positivas de TeAP-Mantecal01 y TeAp-ElFrío01 [Figura 2A]. De igual forma, se verificó la amplificación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, en donde se observaron los múltiples amplicones en forma de barrido, descritos

para la técnica LAMP [**Figura 2D**]. Por lo tanto, se estableció que la temperatura isotérmica óptima de reacción es 60 °C.

**Figura 2:** Gradiente de temperatura del ensayo LAMP para la detección de *T. evansi*. **A, B y C:** Ensayos colorimétricos a diferentes temperaturas. **D, E y F:** Revelado por electroforesis en geles de agarosa. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Control sin templado; **2:** Producto de TeAP-Mantecal01; **3:** Producto de TeAp-ElFrío01.



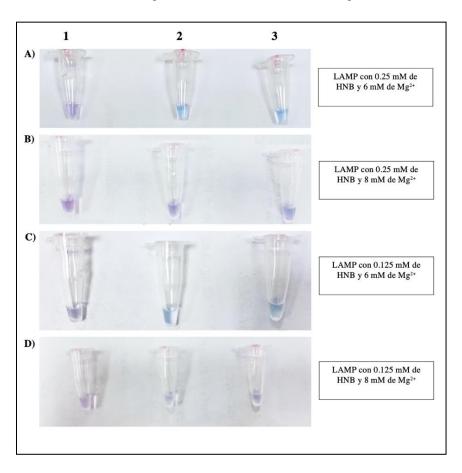
### Evaluación de concentraciones de HNB y Mg<sup>2+</sup>

En la Figura 3 se pueden observar los productos de LAMP con las cuatro condiciones distintas de HNB y Mg<sup>2+</sup>, a una temperatura de 60 °C (**3A, B, C, y D**). Los resultados muestran un cambio de coloración notable entre las muestras positivas y negativas, con las concentraciones de 0.25 mM y 6 mM para el HNB y el Mg<sup>2+</sup> respectivamente [**Figura 3A**], ambas concentraciones

asociadas a la condición A. De igual manera, en la condición C se pudo observar un cambio de coloración en la reacción, sin embargo, los resultados mostraron menor intensidad en el color, por lo que no se considero a este revelado como el óptimo [Figura 3C]. Por último, no se observaron cambios de color notables al analizar las condiciones B y D [Figura 3B, D]. La generación de amplicones en las muestras con la condición A, se verificó por electroforesis en geles de agarosa (resultados no mostrados).

**Figura 3:** Evaluación del revelado colorimétrico de LAMP con distintas concentraciones de HNB y Mg<sup>2+</sup>. **A, B, C** y **D**: Concentraciones variables de HNB y Mg<sup>2+</sup> empleadas.

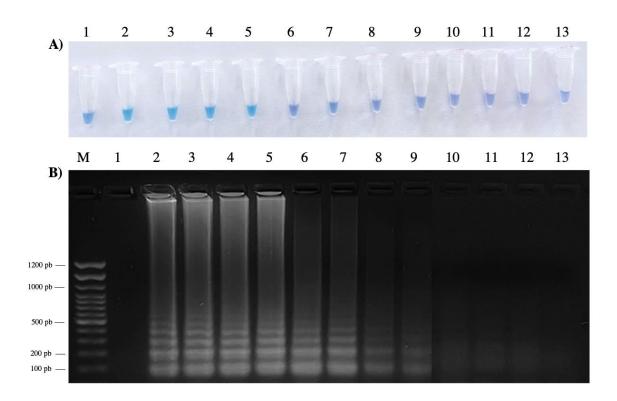
1: Control sin templado; 2: TeAP-Mantecal01; 3: TeAp-ElFrío01



### Sensibilidad Analítica del ensayo LAMP

El límite de detección del ensayo de LAMP colorimétrico fue de 1x10<sup>8</sup> copias de ADN [Figura 4A], mientras que el límite de detección mediante electroforesis en gel de agarosa fue de 1x10<sup>2</sup> copias de ADN [Figura 4B]. Cabe recalcar que el ensayo colorimétrico no tiene tanta sensibilidad como el de electroforesis en gel de agarosa, puesto que la visualización del color solo se observa hasta el tubo 5.

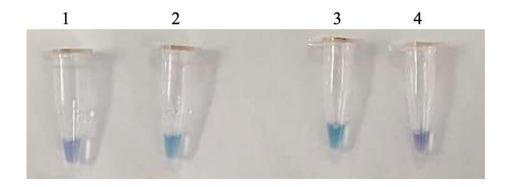
**Figura 4:** Prueba de sensibilidad del ensayo LAMP para la detección de *T. evansi*. (**A**) Evaluación colorimétrica con HNB para los productos LAMP. (**B**) Electroforesis en gel de agarosa de productos LAMP. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Control sin templado; **2:** 1x10<sup>11</sup> copias; **3:** 1x10<sup>10</sup> copias; **4:** 1x10<sup>9</sup> copias; **5:** 1x10<sup>8</sup> copias; **6:** 1x10<sup>7</sup> copias; **7:** 1x10<sup>6</sup> copias; **8:** 1x10<sup>5</sup> copias; **9:** 1x10<sup>4</sup> copias; **10:** 1x10<sup>3</sup> copias; **11:** 1x10<sup>2</sup> copias; **12:** 10 copias; **13:** 1 copia.



### Especificidad del ensayo LAMP

Para la prueba de especificidad, se empleó la muestra derivada de *T. equiperdum* (TeAP-N/D1) como control negativo. Los resultados mostraron que no hubo reacción cruzada con el ADN de *T. equiperdum* [Figura 5], a través del cambio de color de violeta a azul cielo. Adicionalmente, no hubo presencia de bandas en el gel para TeAP-N/D1 (resultados no mostrados).

Figura 5: Prueba de especificidad de LAMP. Prueba de especificidad para la detección de *T. evansi.* 1: TeAP-N/D1, 2: TeAP-Mantecal01, 3: TeAP-ElFrío01, 4: Control sin templado.

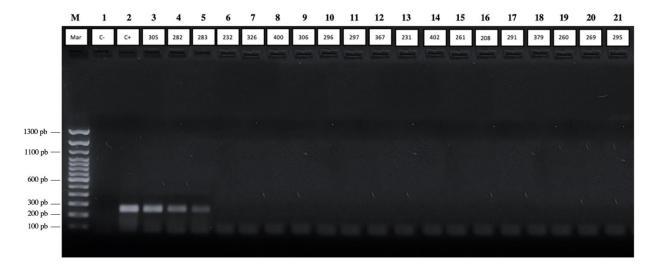


### Detección molecular en muestras de campo por PCR

Para la detección molecular en muestras de campo a través de la técnica de PCR, se utilizaron dos conjuntos de primers: ESAG 6/7 (F/R) y RoTat 1.2 VSG (F/R), siendo los primers ESAG 6/7 específicos para el subgénero *Trypanozoon* (Holland et al., 2001), mientras que los primers RoTat 1.2 VSG son exclusivos para la amplificación de *T. evansi* tipo A (Tong et al., 2018). Los resultados mostraron que al emplear los primers ESAG 6/7 se obtuvo una amplificación exitosa para las muestras provenientes de la provincia de Sucumbíos: 305, 282, y 283. Los amplicones generados se encontraron entre 200 y 300 pb [**Figura 6**]. A partir de estos resultados, se determinó

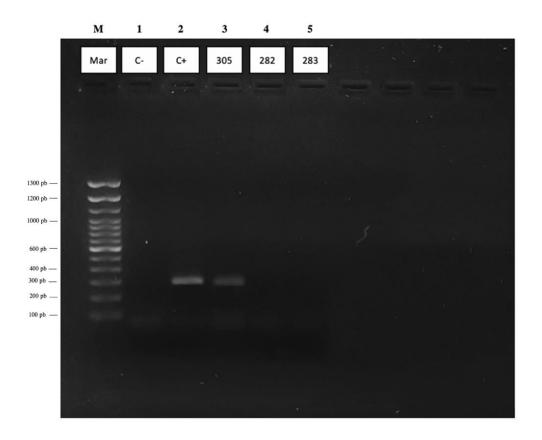
que, de las 19 muestras evaluadas, 3 muestras fueron positivas para tripanosomosis causada por el subgénero *Trypanozoon*, teniendo así una prevalencia general del 15.78 % en la provincia.

**Figura 6:** Evaluación por PCR de las muestras de campo para la detección de *Trypanozoon*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando primers ESAG 6/7. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Control sin templado; **2:** Dilución de un producto de PCR obtenido con los primers ESAG 6/7 a partir de ADN del aislado TeAp- Mantecal01; **3-21:**Muestras de campo pertenecientes a la provincia de Sucumbíos.



En cuanto a los resultados empleando los primers RoTat 1.2 VSG, en el gel de electroforesis se pudo observar una amplificación exitosa para la muestra de campo 305 con una banda cercana a los 300 pb [Figura 7]. A partir de estos resultados, se determinó que de las muestras evaluadas una sola muestra fue positiva para *T. evansi*, teniendo así una prevalencia general estimada del 5.26 % en la provincia de Sucumbíos.

**Figura 7:** Evaluación de las muestras de campo por PCR para la detección de *T. evansi*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando primers RoTat 1.2 VSG en muestras de campo. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Control sin templado; **2:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01; **3-5:** Muestras de campo pertenecientes a la provincia de Sucumbíos.

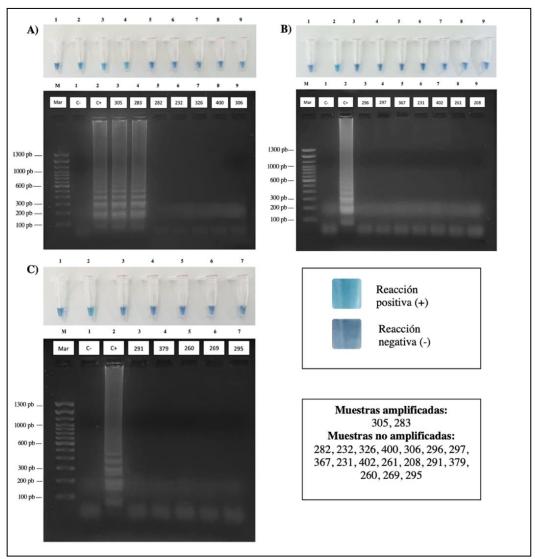


### Detección molecular en muestras de campo por LAMP

De la misma manera, se realizó la detección molecular en muestras de campo a través de la técnica de LAMP. Se obtuvo una amplificación exitosa para las muestras provenientes de la provincia de Sucumbíos: 305 y 283. Los amplicones positivos mostraron un color azul, mientras que las muestras negativas permanecieron en un color violeta. De igual forma, se verificó la amplificación de los productos LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa, en donde se observó un patrón de escalera para las muestras 305 y 283, y la ausencia del patrón para las

muestras negativas [**Figura 8A**, **B**, **y C**]. A partir de estos resultados, se determinó que, de las 19 muestras evaluadas, 2 muestras fueron positivas para tripanosomosis causada por *T. evansi*, obteniendo una prevalencia general del 10.52 % en la provincia de Sucumbíos.

**Figura 8:** Evaluación de las muestras de campo por LAMP para la detección de *T. evansi.* **A, B, y C:** Detección molecular de muestras de campo a nivel colorimétrico y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando primers RoTat 1.2 VSG. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Control sin templado; **2:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp- Mantecal01); **3-9:** Muestras de campo pertenecientes a la provincia de Sucumbíos.



### Determinación de la prevalencia general de tripanosomosis

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la prevalencia de tripanosomosis causada por *Trypanosoma spp*. mediante la técnica de PCR, empleando los primers ESAG 6/7 en la provincia de Sucumbíos, obteniendo una prevalencia total del 15.78 %. En lo que respecta a la especie, se obtuvo un porcentaje del 16.66 % (n = 1/6) para los caninos, 28.57 % (n = 2/7) para los equinos, y 0 % (n = 0/6) para los bovinos. De igual forma, con los primers RoTat 1.2 VSG específicos para *T. evansi* se obtuvo una prevalencia 5.26 %. En lo que respecta a la especie, se obtuvo un porcentaje del 16.66 % (n = 1/6) para los caninos, 0 % (n = 0/7) para los equinos, y 0 % (n = 0/6) para los bovinos.

**Tabla 3.** Resultados de detección molecular de *Trypanosoma spp.* mediante la técnica de PCR.

	P	CR Primers ESAG	6/7	
Especie	n	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)
Caninos	6	5	1	16.66
Equinos	7	5	2	28.57
Bovinos	6	6	0	0
Total	19	16	3	15.78

PCR Primers RoTat 1.2 VSG				
Especie	n	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)
Caninos	6	5	1	16.66
Equinos	7	7	0	0
Bovinos	6	6	0	0
Total	19	18	1	5.26

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la prevalencia de tripanosomosis causada por T. evansi mediante la técnica de LAMP empleando los primers RoTat 1.2 VSG en la provincia de Sucumbíos, obteniendo una prevalencia total del 10.52 %. En lo que respecta a la especie, se obtuvo un porcentaje del 16.66 % (n = 1/6) para los caninos, 14.28 % (n = 1/7) para los equinos, y 0 % (n = 0/6) para los bovinos.

**Tabla 4:** Resultados de detección molecular de *T. evansi* mediante la técnica de LAMP.

LAMP Primers RoTat 1.2 VSG				
Especie	n	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)
Caninos	6	5	1	16.66
Equinos	7	6	1	14.28
Bovinos	6	6	0	0
Total	19	17	2	10.52

### 4. DISCUSION

En este estudio, se llevó a cabo la implementación de la técnica LAMP para determinar la prevalencia de tripanosomosis causada por *T. evansi* en animales de interés pecuario pertenecientes a la provincia de Sucumbíos. El control de esta enfermedad depende en gran medida de un ensayo preciso y sensible, puesto que a medida que disminuye la prevalencia de la tripanosomosis, las nuevas pruebas de detección necesitan una sensibilidad y especificidad mejorada, y de esta manera prevenir la reaparición de la enfermedad (Tong et al., 2018). La detección de tripanosomosis se realiza de forma rutinaria mediante técnicas parasitológicas como la técnica de centrifugación de microhematocrito (MHCT), a través de métodos inmunológicos como el ensayo inmunoabsorbente

ligado a enzimas (ELISA) y métodos moleculares como la PCR (Ramírez-Iglesias et al., 2011). Sin embargo, varias de estas técnicas requieren de instrumentos costosos para su amplificación y detección, o métodos muy elaborados para su desempeño (Fang et al., 2008). Por lo tanto, varios investigadores han trabajado arduamente para superar estas limitaciones. LAMP es una técnica que posee la ventaja frente a otras técnicas moleculares sensibles y específicas, en que es mucho más simple, económica y rápida de realizar, debido a que solamente requiere de un dispositivo de calentamiento para su incubación, haciendo que se realice incluso en campo (Laohasinnarong et al., 2011; Thekisoe et al., 2007).

En el presente estudio, para la estandarización del ensayo LAMP se establecieron distintas condiciones a evaluar tales como: temperatura, tiempo y concentraciones de HNB y Mg<sup>2+</sup>, debido a que el revelado que se empleó es distinto al originalmente descrito por Tong *et al.* (2018). Como primer paso se verificó la temperatura óptima de amplificación, para ello se realizó un gradiente que empleó las siguientes temperaturas: 60 °C, 62.5 °C, y 65°C. El gradiente de temperatura se evaluó según lo descrito por varios autores. En el estudio de Notomi *et al.* (2000), mencionan que la temperatura de incubación debe estar entre los 60-65 °C, y el estudio de Duan *et al.* (2014), coincide con el rango de temperatura descrito anteriormente. En este estudio se pudo evidenciar que nuestro ensayo LAMP tuvo una temperatura de incubación óptima a 60 °C, debido a que la técnica empleó la ADN polimerasa Thermo Fisher Scientific *Bsm*, la cual trabaja a una temperatura óptima de 60 °C (Thermo Fisher, 2020). Esta polimerasa fue elegida para su uso en el laboratorio debido a que sus costos son mucho menores en comparación con otras polimerasas con actividad desplazante de hebra, como la *Bst* (New England BioLabs®). De igual forma, la *Bsm* Taq

(ThermoFisher Scientific) se considera una enzima adecuada para métodos de amplificación de ADN isotérmicos como LAMP y otros ensayos moleculares, ya que posee una gran similitud funcional con la ADN polimerasa Bst (New England BioLabs®) y puede reemplazarle en la mayoría de sus aplicaciones (Thermo Fisher, 2020). Igualmente, es importante mencionar que en este estudio se realizaron pruebas asociadas al tiempo de reacción, en el cual se pudo determinar que 30 minutos fue el tiempo óptimo de ciclado para el ensayo LAMP. El estudio de Tong et al. (2018) también indica que el ciclado de reacción debe ser de 30 minutos. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el ensayo por 60 minutos, se produjo la presencia de falsos positivos, esto puede ser debido a que la ADN polimerasa que se empleo fue la Bsm (ThermoFisher Scientific), la cual posee una amplificación eficiente en un tiempo aproximado de 30 minutos (Thermo Fisher, 2020), además para que ocurra la reacción LAMP es necesario el plegamiento de al menos cuatro primers con capacidad para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN diana, siendo un paso fundamental para la eficacia de LAMP (Notomi et al., 2000), debido a esto, es posible que al momento de colocar la reacción durante 60 minutos, haya provocado un plegamiento no específico entre los primers, y de esta manera, producir una señal falsa positiva convincente (Petrone et al., 2015), puesto que si existe la ausencia de uno de ellos no ocurre una reacción satisfactoria, lo que indica que el plegamiento de al menos cuatro primers es un requisito estricto para que se de el reconocimiento de seis secuencias distintas en el ADN objetivo (Notomi et al., 2000).

Para el ensayo colorimétrico de la técnica, se utilizó HNB como método de revelado debido a que los costos son mucho menores frente a otros ensayos colorimétricos existentes para LAMP. El uso de HNB es considerado como una alternativa prometedora para la visualización

colorimétrica de los amplicones, los cuales pueden evaluarse a través de varios métodos, incluida la inspección visual y la absorbancia (Fischbach et al., 2015). De manera similar, el uso de HNB tiene varias ventajas que incluyen: operación sencilla; sensibilidad alta; menor riesgo de contaminación, y detección de ADN con un alto rendimiento (Goto et al., 2009). Según lo descrito por Goto et al. (2009) y Zaczek-Moczydłowska et al. (2020) mencionan que la reacción se puede llevar a cabo agregando HNB a la mezcla de reacción con una concentración final de 120 µM (0.12 mM) y 8 mM de Mg<sup>2+</sup>. Sin embargo, para el ensayo de este estudio empleando dicha concentración, no permitió la generación de un cambio de color significativo entre muestras positivas y negativas, por lo que la condición óptima evaluada en este estudio fue de 0.25mM de HNB y 6 mM de Mg<sup>2+</sup>, debido a que esta condición favoreció el revelado de la amplificación de ADN, mediante un notable cambio de color de violeta (negativo / inicio de la reacción) a azul cielo (positivo / final de la reacción). Del mismo modo, esta diferencia de concentraciones de HNB y Mg<sup>2+</sup> con otros estudios puede estar relacionada principalmente con el pH en que se encuentra la solución, asimismo puede verse afectado por la concentración de Mg<sup>2+</sup> o por la concentración de dNTP, ya que reducen los iones Mg<sup>2+</sup> disponibles en la reacción (Goto et al., 2009) o debido a las diferencias intrínsecas de los reactivos usados en nuestro ensayo. Un aspecto importante a tomar en cuenta al momento de implementar azul de hidroxinaftol en ensayos LAMP, es la naturaleza del indicador de metales (HNB), ya que este reactivo se lo puede encontrar en dos presentaciones: la sal disódica de HNB y la sal trisódica de HNB. Según varios reportes, han indicado que la forma disódica no genera una coloración adecuada, pues esta es transparente y clara, y por lo tanto, no permite la detección colorimétrica en ensayos LAMP (Vienna BioCenter, 2020), a diferencia de la sal trisódica de HNB

utilizada en este estudio, debido a la intensidad del color notable, presente en la reacción. Por otra parte, los resultados de sensibilidad usando HNB revelan que la técnica de LAMP es capaz de amplificar y detectar hasta una concentración de 1x108 copias de ADN, mientras que en el gel de electroforesis la capacidad de detección fue de  $1x10^2$  copias de ADN (equivalente a 0.042 fg/ $\mu$ L). Esta diferencia puede deberse a ciertos factores tales como: los reactivos empleados en la reacción, los cambios de temperatura, el programa de ciclado, la calidad y concentración del ADN, o los cambios de concentraciones utilizando HNB y Mg<sup>2+</sup>. En cuanto a la colorimetría de la reacción se pudo observar un cambio de color de violeta a azul; y un patrón en forma de escalera en el gel de electroforesis, cabe recalcar que la formación de amplicones se detectó incluso en muestras en las cuales el color del tubo se mantuvo violeta, demostrando que a pesar de que la sensibilidad colorimétrica fue baja, los resultados obtenidos en el gel fueron altamente sensibles, lo que representa que la técnica sirve como un buen indicador de su aplicabilidad en campo para detectar un individuo con una carga parasitaria baja (Chahar et al., 2019). En estudios previos, la técnica se ha empleado para la detección de T. evansi demostrando ser un ensayo altamente sensible en comparación con la microscopía convencional y la PCR, obteniendo un límite de detección de hasta 1 fg de ADN (Tong et al., 2018). De igual manera, en el estudio de Thekisoe et al. (2007) coinciden con lo descrito anteriormente en relación a la alta sensibilidad de LAMP, capaz de detectar hasta 1 fg de ADN tripanosomátido. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que el ensayo LAMP es altamente sensible y se lo puede utilizar como una herramienta para el control de tripanosomosis en áreas donde la infección causada por T. evansi es una amenaza para el ganado (Tong et al., 2018),

De igual forma, se evaluó la especificidad de LAMP la cual no presentó reactividad cruzada con *T. equiperdum* TeAp-N/D1, especie con gran importancia epidemiológica y evolutivamente muy cercano a *T. evansi*, además de que posee la capacidad de afectar a hospedadores similares, y perteneciente al mismo subgénero de *T. evansi*. Esta es la razón de hacer pruebas de especificidad relacionadas con el ADN de este parásito. Los resultados reportados demuestran que el ensayo LAMP es altamente específico para la secuencia diana, esto es atribuible debido al uso de cuatro primers distintos especialmente diseñados para reconocer seis regiones distintas del ADN objetivo (Notomi et al., 2000).

Se han realizado pocos estudios con respecto al control y la determinación de la prevalencia de tripanosomosis en el oriente ecuatoriano. Por tal razón, es necesario el desarrollo de ensayos de detección mucho más sensibles y precisos en áreas donde los recursos en su mayoría son limitados (Namangala et al., 2013). En el presente estudio, se realizó la detección de *Trypanozoon* en muestras de campo a través de la técnica de PCR, la cual empleó dos conjuntos de primers ESAG 6/7, a partir de 19 muestras de animales de interés pecuario, de las cuales 3 muestras (305, 282, y 283) tuvieron una amplificación exitosa positiva, obteniendo una prevalencia mayor en equinos del 28.57 % con 2 positivos de 7 muestras evaluadas, en caninos la prevalencia fue del 16.66 % con 1 positivo de 6 muestras evaluadas, y no hubo presencia de casos positivos en bovinos, arrojando una prevalencia general del 15.78 %. Los resultados sugieren que existe la presencia de infecciones por especies pertenecientes a este subgénero, cabe recalcar que no es posible identificar la especie concreta con el uso de estos primers (ESAG 6/7), debido a la gran similitud genómica entre estos tripanosomátidos, y a la gran conservación de la secuencia dentro del subgénero *Trypanozoon*.

aunque hay que destacar que el uso de los primers ESAG 6/7 puede emplearse con éxito para distinguir la presencia general de especies pertenecientes al subgénero *Trypanozoon* (Sawitri et al., 2015). Es importante mencionar que *T. brucei* es endémico del África subsahariana y emplea la mosca tsetsé *Glossina spp.* como vector (Steverding, 2008), por lo que no se ha descrito la presencia de esta especie en América Latina. De tal modo, que los amplicones positivos posiblemente pertenezcan al ADN genómico de *T. evansi* o *T. equiperdum*.

Para obtener una identificación entre T. evansi y T. equiperdum, las muestras de campo se evaluaron a través de la técnica de PCR empleando los primers RoTat 1.2 VSG capaz de distinguir a T. evansi de otras especies de tripanosoma (Urakawa et al., 2001). Los resultados indicaron que de todas las muestras evaluadas, solo la muestra 305 amplificó con éxito el gen de la glicoproteína RoTat 1.2 VSG, de este modo, las muestras que fueron positivas por ESAG 6/7 y negativas por RoTat 1.2 VSG puede ser debido a que los primers ESAG 6/7 tienen la capacidad de amplificar una región altamente conservada que codifica al complejo heterodimérico del receptor de transferrina (Kabiri & Steverding, 2001), o posiblemente pertenezcan a la especie de T. equiperdum, haciendo que sea necesario el empleo de otras técnicas moleculares que permitan identificar de mejor manera a esta especie. Del mismo modo, se desarrolló un ensayo LAMP dirigido hacia la misma región RoTat 1.2 VSG, en el cual se obtuvo un revelado colorimétrico exitoso con un cambio de color, de violeta a azul cielo para una reacción positiva. Los resultados indicaron que LAMP pudo detectar con éxito el aislado de T. evansi en 2 de las 19 muestras evaluadas (muestras 305 y 283), cabe recalcar que la muestra 283 solo fue positiva por PCR utilizando los primers ESAG 6/7, y que gracias a la técnica de LAMP se pudo determinar que la

muestra 283 pertenece a la especie de *T. evansi*, por ende, este resultado indica que la muestra que fue positiva por LAMP y negativa por PCR se podría relacionar con la alta sensibilidad que posee la técnica. De este modo, tras el desarrollo de PCR y LAMP empleando los primers RoTat 1.2 VSG se obtuvo una prevalencia del 5.26 % y 10.52 % respectivamente. En lo que respecta a la especie, por PCR, se obtuvo una prevalencia mayor en caninos del 16.66 % con 1 positivo de 6 muestras evaluadas, y las muestras procedentes de equinos y bovinos no presentaron casos positivos, mientras que para LAMP se obtuvo una prevalencia mayor del 16.66 % en caninos con 1 positivo de 6 muestras evaluadas, la prevalencia de equinos fue del 14.28 % con 1 positivo de 7 muestras evaluadas, y no hubo casos positivos en bovinos. Lo que indica que existe la posible presencia de T. evansi en caninos y equinos en la parroquia de Aguas Negras en Sucumbíos, además de que el área se encuentra expuesta a este agente infeccioso, que de alguna u otra manera es un factor de riesgo para los animales que habitan en esa zona. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, se pudo determinar que el ensayo LAMP en este estudio tuvo una sensibilidad del 100% (n=1/1) en comparación con la PCR, ya que la técnica fue capaz de detectar el ADN de T. evansi en todas las muestras positivas por PCR RoTat 1.2 VSG. Del mismo modo, se puede decir que la técnica de LAMP puede ser aplicable en campo, siendo un método altamente sensible, rápido, específico y fácil de usar, el cual posee el potencial de ser una herramienta principal futura en la detección molecular de tripanosomosis y otras enfermedades infecciones (Namangala et al., 2013).

Se han realizado pocos estudios en Ecuador con respecto a la presencia de *Trypanosoma spp.*, y en varios de ellos solo se ha determinado la presencia del género, más no de la especie. Las técnicas comúnmente empleadas para la detección de esta enfermedad han sido mediante PCR o

ELISAi. El primer reporte en Ecuador mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, reportó una seroprevalencia del 22.5% (Wells et al., 1977). En un estudio reciente efectuado por Burgos Chávez (2021) se detectó una seroprevalencia general del 8 % para tripanosomosis causada por Trypanosoma spp. en 9 parroquias de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas a través del ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAi). De igual manera, en el estudio de Hinojosa Castillo (2021) mediante la misma técnica (ELISAi) se detectó una seroprevalencia general del 16.82 % en 3 provincias del Oriente ecuatoriano (Napo, Orellana y Sucumbíos). Los resultados alcanzados revelan que la prevalencia obtenida en este estudio es comparable con lo expuesto por otros autores. Sin embargo, la diferencia de prevalencias obtenida en el presente estudio en comparación a los estudios mencionados, puede ser debido a varios factores tales como: el sitio donde se llevó a cabo el muestreo, la metodología empleada, la cantidad de muestras evaluadas, la distribución o época del muestreo, entre otras. En relación a otros estudios, se puede mencionar el estudio de Chávez-Larrea et al. (2021) el cual reporta una prevalencia del 15% para T. vivax, empleando la técnica de PCR en la región costera del Ecuador, Provincia de Manabí. Ortega-Montalvo et al. (2014) reportaron una prevalencia del 30.26% respectivamente, mediante la técnica de Woo y PCR en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas. De acuerdo a lo reportado por estos estudios y los hallazgos del presente trabajo, se destaca la importancia de aplicar una técnica sensible y precisa distinta a los métodos comúnmente empleados tales como la PCR y la técnica de ELISAi, debido a que estos procesos requieren de una instrumentación sofisticada y costosa que normalmente se encuentran solamente en laboratorios bien establecidos, lo que limita en gran medida el amplio uso de estos métodos en campo o en países que se encuentran

en vías de desarrollo. Es por ello que, hasta el momento, este es el primer trabajo utilizando un ensayo sensible, económico y preciso como lo es LAMP para la detección molecular de tripanosomosis causada por *T. evansi* en la provincia de Sucumbíos.

Al momento de establecer una comparación de cifras acerca de las prevalencias obtenidas en el presente estudio con países cercanos a la región, se pudo encontrar que en la actualidad T. evansi ha sido reportado en varios países tales como Brasil, Perú, Venezuela y Colombia; sin embargo, se dispone de poca información acerca de la distribución y epizootiología de T. equiperdum en América del Sur (Dávila & Silva, 2000). Brasil es el país con más información acerca de la situación de T. evansi en Sudamérica (Aregawi et al., 2019). Por ejemplo, en la región de Pantanal en Brasil a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección del antígeno de T. evansi se reportó una seroprevalencia del 4.1%, 2.3%, 7.1% y 22% en caballos, bovinos, perros y capibaras respectivamente (Franke et al., 1994), en el estudio de Ramírez-Iglesias et al. (2017) evaluaron la prevalencia de T. evansi en una población de bovinos en el estado de Aragua-Venezuela obteniendo una prevalencia del 18.4% mediante MHCT y 50% a través de la técnica de PCR. De igual manera, en un estudio realizado en el mismo país se encontró una prevalencia del 81.7% en caballos de trabajo y un 57.14% en caballos de establo a través del ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Reyna-Bello et al., 1998). En Colombia se ha descrito una seroprevalencia de T. evansi del 59.7% mediante la técnica de ELISA indirecto (Jaimes-Dueñez et al., 2019), además de que se han reportado pérdidas económicas a causa de la tripanosomosis bovina que logran alcanzar los 5.2 millones de dólares por año (Gonzatti et al., 2014). Por lo tanto, de acuerdo a la información variada que poseen otras naciones del continente

acerca de esta enfermedad, y debido a que en el Ecuador, la tripanosomosis es considerada una enfermedad desatendida (Chávez-Larrea et al., 2021), hacen que sea necesario la obtención de resultados preliminares tal como se muestra en este estudio, y de esta manera conocer más ampliamente la situación de esta enfermedad en distintas regiones del Ecuador.

La presencia del subgénero *Trypanozoon* en distintos animales de interés pecuario en este estudio, es un factor de riesgo potencial que se debe analizar, para determinar si es necesario realizar procesos de control y vigilancia epidemiológico que de alguna u otra forma permitan minimizar el impacto de este protozoario hemoflagelado en el país. Del mismo modo, por su ubicación geográfica y su biodiversidad, Ecuador posee las condiciones ecológicas óptimas para el desarrollo de varios vectores (Cárdenas et al., 2009), provocando que exista un mayor riesgo de proliferación del parásito en el Oriente ecuatoriano. Esta es la razón principal, por la que el desarrollo de ensayos altamente sensibles y específicos es de suma importancia para determinar el agente infeccioso presente en varias poblaciones animales, y de esta manera plantear futuras estrategias, cuyo objetivo sea prevenir la propagación de enfermedades.

#### 5. CONCLUSIONES

En este estudio, se realizó la estandarización de la técnica de LAMP para la detección de tripanosomosis causada por *T. evansi* en la región Oriente del Ecuador, cuyas condiciones fueron las óptimas para su uso en campo. De igual manera, se empleó la técnica de PCR para la detección del subgénero *Trypanozoon* y para *T. evansi* en distintos animales de interés pecuario pertenecientes a la provincia de Sucumbíos. La prevalencia general obtenida mediante PCR fue del 15.78% para el subgénero *Trypanozoon* y 5.26% para *T. evansi*, mientras que en el ensayo LAMP

la prevalencia general obtenida fue del 10.52%, lo cual indica la posible presencia del agente infeccioso en la zona evaluada. El ensayo LAMP es una técnica innovadora, que puede emplearse como una herramienta de detección molecular rápida y sencilla para una amplia gama de enfermedades infecciosas, además de ser simple de operar y adaptarse fácilmente a cualquier entorno y circunstancia en el campo. Por ende, gracias a la implementación de una técnica sensible, específica y económica se pueden tomar medidas de control efectivas para así evitar, tanto, la propagación de la infección como las pérdidas económicas en el ámbito ganadero.

#### 6. RECOMENDACIONES

Se recomienda que durante el desarrollo del ensayo LAMP, se realicen alícuotas para cada reactivo y se utilice material totalmente estéril, ya que la técnica es susceptible a contaminación por arrastre, que a menudo produce falsos positivos en los controles negativos. De igual forma, se debe tomar en cuenta que el cambio de temperatura, los reactivos empleados y el tiempo pueden afectar el rendimiento óptimo de la reacción o el revelado de LAMP.

Se requiere realizar más estudios para determinar la posible presencia de tripanosomosis en el territorio ecuatoriano, especialmente de *T. equiperdum*, mediante el uso de primers específicos y técnicas moleculares que permitan la identificación clara y precisa de esta especie de gran importancia epidemiológica. Además, se debe trabajar con una población mucho mayor, con la finalidad de obtener datos preliminares precisos, y de esta forma aumentar el nivel de confiabilidad de los datos reportados en este estudio.

#### 7. BIBLIOGRAFIA

- Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Büscher, P. (2019). Systematic review and metaanalysis on the global distribution, host range, and prevalence of Trypanosoma evansi. *Parasites & Vectors* 2019 12:1, 12(1), 1–25. https://doi.org/10.1186/S13071-019-3311-4
- Burgos Chávez, M. A. (2021). Determinación de la seroprevalencia de la tripanosomosis causada por trypanosoma spp. en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. 1–37. https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4239
- Cárdenas, R. E., Buestán, J., & Dangles, O. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Https://Doi.Org/10.1080/00379271.2009.10697633*, 45(4), 511–528. https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697633
- Chahar, M., Anvikar, A., & Valecha, N. (2019). Development and evaluation of a novel HNB based isothermal amplification assay for fast detection of pyrimethamine resistance (S108N) in Plasmodium Falciparum. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(9). https://doi.org/10.3390/IJERPH16091635
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of Trypanosoma (Duttonella) vivax outbreak in cattle population from Ecuador. Transboundary and Emerging Diseases, 68(4), 2422–2428. https://doi.org/10.1111/TBED.13906
- Cordero del Campillo, M., & Rojo Vázquez, F. A. (1999). Parasitología veterinaria. In M. Cordero del Campillo & F. A. Rojo Vázquez (Eds.), *Parasitología Veterinaria* (1ª, 1ª Rei). McGraw-

- Hill Interamericana de España. https://docer.com.ar/doc/ns1e51x
- Dao Thi, V. L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P. M., Kirrmaier, D., Freistaedter,
  A., Papagiannidis, D., Galmozzi, C., Stanifer, M. L., Boulant, S., Klein, S., Chlanda, P.,
  Khalid, D., Miranda, I. B., Schnitzler, P., Kräusslich, H. G., Knop, M., & Anders, S. (2020).
  A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science Translational Medicine*, 12(556).
  https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABC7075/SUPPL\_FILE/PAP.PDF
- Dávila, A. ., & Silva, R. A. (2000). Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *916*, 199–212. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB05291.X
- Desquesnes, M. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. In *OIE*(World Organisation for Animal Health) (Issue 1).

  https://doi.org/10.1017/s0031182005007870
- Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., & Jittaplapong, S. (2013). Trypanosoma evansi and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*. https://doi.org/10.1155/2013/194176
- Duan, Y., Zhang, X., Ge, C., Wang, Y., Cao, J., Jia, X., Wang, J., & Zhou, M. (2014). Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in Fusarium graminearum. *Scientific Reports*, 4. https://doi.org/10.1038/SREP07094

- Fang, X.-E., Li, J., & Chen, Q. (2008). One New Method of Nucleic Acid Amplification-Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA. *VIROLOGICA SINICA*, *23*(3), 167–172. https://doi.org/10.1007/s12250-008-2929-8
- Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M., & Glökler, J. F. (2015). Shining a light on LAMP assays-a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine.

  \*BioTechniques\*, 58(4), 189–194.

  https://doi.org/10.2144/000114275/ASSET/IMAGES/LARGE/TABLE1.JPEG
- Franke, C. R., Greiner, M., & Mehlitz, D. (1994). Investigations on naturally occurring Trypanosoma evansi infections in horses, cattle, dogs and capybaras (Hydrochaeris hydrochaeris) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Tropica*, 58(2), 159–169. https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90055-8
- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). Trypanosoma (duttonella) vivax and typanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. *Trypanosomes and Trypanosomiasis*, 261–285. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\_11
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K.-I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Https://Doi.Org/10.2144/000113072, 46(3), 167–172. https://doi.org/10.2144/000113072
- Hinojosa Castillo, D. A. (2021). *Determinación de la seroprevalencia de tripanosomosis bovina* causada por trypanosoma spp. En tres provincias del oriente ecuatoriano (Napo, Orellana, Sucumbíos). 1–36. https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4253

- Holland, W. G., Claes, F., My, L. N., Thanh, N. G., Tam, P. T., Verloo, D., Büscher, P., Goddeeris,
  B., & Vercruysse, J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for
  Trypanosoma evansi diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 97(1), 23–33. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00381-8
- Jaimes-Dueñez, J., Zapata-Zapata, C., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2019).
  Evaluation of an alternative indirect-ELISA test using in vitro-propagated Trypanosoma
  brucei brucei whole cell lysate as antigen for the detection of anti-Trypanosoma evansi IgG
  in Colombian livestock. *Preventive Veterinary Medicine*, 169, 104712.
  https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.104712
- Kabiri, M., & Steverding, D. (2001). Trypanosoma evansi: Demonstration of a Transferrin Receptor Derived from Expression Site-Associated Genes 6 and 7. *The Journal of Parasitology*, 87(5), 1189. https://doi.org/10.2307/3285262
- Kumar, B., Maharana, B. R., Brahmbhatt, N. N., Thakre, B. J., & Parmar, V. L. (2021).
  Development of a loop-mediated isothermal amplification assay based on RoTat1.2 gene for detection of Trypanosoma evansi in domesticated animals. *Parasitology Research* 2021 120:5, 120(5), 1873–1882. https://doi.org/10.1007/S00436-021-07118-7
- Laohasinnarong, D., Thekisoe, O. M. M., Malele, I., Namangala, B., Ishii, A., Goto, Y., Kawazu, S. I., Sugimoto, C., & Inoue, N. (2011). Prevalence of Trypanosoma sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology Research*, 109(6), 1735–1739. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2513-2

- Namangala, B., Oparaocha, E., Kajino, K., Hayashida, K., Moonga, L., Inoue, N., Suzuki, Y., & Sugimoto, C. (2013). Preliminary Investigation of Trypanosomosis in Exotic Dog Breeds from Zambia's Luangwa and Zambezi Valleys Using LAMP. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(1), 116. https://doi.org/10.4269/AJTMH.13-0078
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12). https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63
- Ortega-Montalvo, H., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2014). First report and molecular identification of Trypanosoma vivax in cattle from Ecuador. https://www.researchgate.net/publication/274006869\_First\_report\_and\_molecular\_identification\_of\_Trypanosoma\_vivax\_in\_cattle\_from\_Ecuador
- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Da Costa, S. C. G. (2008). Trypanosoma (Duttonella) vivax: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001
- Parra-Gimenez, N., & Reyna-Bello, A. (2019). Parasitological, Hematological, and Immunological Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan Isolates of Trypanosoma evansi, Trypanosoma equiperdum, and Trypanosoma vivax. *Journal of Parasitology Research*. https://doi.org/10.1155/2019/8528430
- Petrone, B. L., Wolff, B. J., De Laney, A. A., Diaz, M. H., & Winchell, J. M. (2015). Isothermal detection of Mycoplasma pneumoniae directly from respiratory clinical specimens. *Journal*

- of Clinical Microbiology, 53(9), 2970–2976. https://doi.org/10.1128/JCM.01431-15
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Gómez-Piñeres, E., & Mendoza, M. (2011). Trypanosoma evansi: a comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Experimental Parasitology*, *128*(1), 91–96. https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2011.02.010
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2017). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax infections. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 450–458. https://doi.org/10.1007/S12639-016-0826-X
- Reyna-Bello, A., García, F. A., Rivera, M., Sansó, B., & Aso, P. M. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-Trypanosoma evansi equine antibodies. *Veterinary Parasitology*, 80(2), 149–157. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00199-X
- Sahoo, P. R., Sethy, K., Mohapatra, S., & Panda, D. (2016). Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Veterinary World*, *9*(5), 465–469. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469
- Sánchez, E., Perrone, T., Recchimuzzi, G., Cardozo, I., Biteau, N., Aso, P., Mijares, A., Baltz, T., Berthier, D., Balzano-Nogueira, L., & Gonzatti, M. (2015). Molecular characterization and classification of Trypanosoma spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/S13071-015-1129-2
- Sawitri, D. H., Wardhana, A. H., Wibowo, H., Sadikin, M., & Ekawasti, F. (2015). Molecular

- identification technique of Trypanosoma evansi by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 20(4), 297–307.

  https://doi.org/10.14334/JITV.V20I4.1248
- Steverding, D. (2008). The history of African trypanosomiasis. *Parasites and Vectors*, 1(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-3/
- Thekisoe, O. M. M., Kuboki, N., Nambota, A., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Igarashi, I., Yasuda, J., & Inoue, N. (2007). Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. *Acta Tropica*, 102(3), 182–189. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.004
- Thekisoe, O. M. M., Rambritch, N. E., Nakao, R., Bazie, R. S., Mbati, P., Namangala, B., Malele, I., Skilton, R. A., Jongejan, F., Sugimoto, C., Kawazu, S. I., & Inoue, N. (2010). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of Theileria parva infections targeting the PIM and p150 genes. *International Journal for Parasitology*, 40(1), 55–61. https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2009.07.004
- Thermo Fisher. (2020). *Lyo-ready DNA Polymerases and Reverse Transcriptases for Commercial Supply | Thermo Fisher Scientific EC*. https://www.thermofisher.com/ec/en/home/about-us/partnering-licensing/oem-commercial-supply/molecular-diagnostics-commercial-supply/real-time-pcr/lyo-ready-pcr-enzymes-reverse-transcriptases-commercial-supply.html
- Tong, Q., Chen, R., Kong, Q., Goossens, J., Radwanska, M., Lou, D., Ding, J., Zheng, B., Fu, Y., Wang, T., Stefan, M., & Lu, S. (2018). DNA detection of Trypanosoma evansi: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Veterinary*

- Parasitology, 250, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.006
- Urakawa, T., Verloo, D., Moens, L., Büscher, P., & Majiwa, P. A. O. (2001). Trypanosoma evansi:

  Cloning and Expression in Spodoptera fugiperda Insect Cells of the Diagnostic Antigen

  RoTat1.2. Experimental Parasitology, 99(4), 181–189.

  https://doi.org/10.1006/EXPR.2001.4670
- Vienna BioCenter. (2020). *A note on HNB dye RTLAMP*. https://www.rtlamp.org/2021/02/02/hnb-dye/
- Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of Trypanosoma vivax in the New World. *Protozoology*, 71(5), 448–449. https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643. https://doi.org/10.1111/jam.13647
- Zaczek-Moczydłowska, M. A., Mohamed-Smith, L., Toldrà, A., Hooper, C., Campàs, M., Dolors Furones, M., Bean, T. P., & Campbell, K. (2020). A Single-Tube HNB-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Robust Detection of the Ostreid herpesvirus 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–15. https://doi.org/10.3390/IJMS21186605