

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN  
ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA”**

Realizado por:

**GUSTAVO MIGUEL GUAYAQUIL ORTIZ**

Director del proyecto:

**Dr. José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Quito, 7 de marzo de 2022

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, GUSTAVO MIGUEL GUAYAQUIL ORTIZ, con cédula de identidad # 171987288-7, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o 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

171987288-7

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN  
ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA”**

Realizado por:

**GUSTAVO MIGUEL GUAYAQUIL ORTIZ**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

ha sido dirigido por el profesor

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO**

**LINO ARISQUETA HERRANZ**

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



FIRMA



FIRMA

Quito, 7 de marzo de 2022

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**DEDICATORIA**

Si algo muy pequeño hubiera sido diferente o no hubiera compartido con alguna persona a lo largo de toda mi vida, es posible que, ahora estuviese en un lugar totalmente diferente. Por esto, en agradecimiento, dedico este trabajo a Dios y a la vida, por todo lo que he vivido estos años, todas las experiencias y personas que he conocido, hasta alcanzar esta meta.

A mi madre Miryan Ortiz, por su sacrificio y amor incondicional como madre, y por enseñarme que no existen límites para lo que quiera alcanzar.

A mi padre Patricio Guayaquil, por enseñarme a no decaer y a hacerle frente a todas las adversidades, y darme el mejor regalo “La Educación”.

A mi hermano Emilio Guayaquil, por ser mi más grande orgullo y por quien quiero ser una mejor persona cada día.

A toda mi familia, por todo el amor y apoyo que siempre me dan.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Internacional SEK, junto con todos los profesores y compañeros que  
me han ayudado, por formarme como profesional.

Al Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis - CIZ de la Universidad  
Central del Ecuador, por la facilitación de las muestras de campo empleadas en este estudio.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A mi tutor José Rubén, por compartir sus conocimientos, su apoyo y mostrarme todas  
las cualidades que debe tener un profesional.

A mi gran amiga Camila Chávez, por su increíble amistad durante todos los años de  
carrera y su gran apoyo en todas las etapas del proyecto.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

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 Iglesias, Ph.D.**

**Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación**

DII-UISEK-P011617\_2

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

07/03/2022 10:00:00

Para someter a:

To be submitted:

**Implementación de la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)  
para la detección de *Trypanosoma spp.* en animales de interés pecuario en la provincia de  
Orellana**

Gustavo Miguel Guayaquil Ortiz <sup>1,2</sup>, José Rubén Ramírez Iglesias<sup>2\*</sup>, Juan Carlos Navarro<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

07/03/2022

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

Teléfono: +593-986391273; email: [jose.ramirez@uisek.edu.ec](mailto:jose.ramirez@uisek.edu.ec)

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

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

## Resumen

En América del Sur se encuentran las especies *T. equiperdum* y *T. evansi*, pertenecientes al subgénero *Trypanozoon*, que causan tripanosomosis, una enfermedad que ha tenido un gran impacto en el sector pecuario en todo el mundo. A pesar de que, existen reportes de la presencia de tripanosomas en países cercanos al Oriente ecuatoriano, en Ecuador hay pocos estudios correspondientes al subgénero *Trypanozoon*. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue implementar técnicas de detección molecular como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de *Trypanosoma spp.* en animales de interés pecuario, y proporcionar una visión regional de la epidemiología de la tripanosomosis causada por el subgénero *Trypanozoon*, en la provincia de Orellana, Ecuador. El ensayo LAMP se estandarizó en el laboratorio para la detección de *T. evansi*, dirigido al gen de la glicoproteína variable de superficie (VSG) del Rode Trypanozoon antigenic type 1.2 (RoTat 1.2 VSG). Este ensayo se basa en la variación de la concentración de  $Mg^{2+}$  durante la reacción LAMP para tener un revelado colorimétrico utilizando azul de hidroxinaftol (HNB), una reacción positiva se indica mediante un cambio de color de violeta a azul cielo. La reacción LAMP se llevó a cabo en un tiempo de 30 minutos, tuvo una sensibilidad analítica de 100 copias de ADN y no tuvo reactividad cruzada con *T. equiperdum*. Se utilizaron las técnicas LAMP y PCR para la detección de *Trypanosoma spp.* en 19 muestras de campo provenientes de la parroquia García Moreno, Orellana. La detección del subgénero *Trypanozoon* se realizó por PCR, por medio de los cebadores ESAG 6/7, obteniendo una prevalencia del 68.42% (13/19), la detección de *T. evansi* se llevó a cabo por medio de LAMP RoTat 1.2 VSG y para comparar la validez de los resultados se realizó PCR para el mismo gen diana. Estos ensayos revelaron 4 resultados coincidentes, 1 positivo por LAMP y negativo por PCR, y 1 positivo por PCR y negativo por LAMP, obteniendo una prevalencia para ambas técnicas del 26.32% (5/19). Estos resultados

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

indican la presencia del subgénero *Trypanozoon* en los animales domésticos de la parroquia García Moreno e indican un riesgo potencial para todos los animales presentes en la zona. Por lo cual, se hace necesaria la implementación de estudios epidemiológicos y de diagnóstico que incrementen el nivel de precisión y cantidad de muestras.

***Palabras clave:***

*Trypanosoma spp.*, *Trypanozoon*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, HNB, LAMP, PCR

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

## Abstract

In South America the species *T. equiperdum* and *T. evansi* are present, that belong to the subgenus *Trypanozoon*, which cause trypanosomosis, a disease that has had a great impact on the livestock throughout the world. Although there are reports of the presence of trypanosomes in countries near the Ecuadorian East, in Ecuador there are few studies corresponding to the *Trypanozoon* subgenus. For this reason, the objective of this study was to implement molecular detection techniques such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Trypanosoma spp.* in animals of livestock interest and provide a regional overview of the epidemiology of trypanosomosis caused by the subgenus *Trypanozoon*, in the province of Orellana, Ecuador. The LAMP assay was standardized in the laboratory for the detection of *T. evansi*, targeting the variant surface glycoprotein (VSG) gene of Rode Trypanozoon antigenic type 1.2 (RoTat 1.2 VSG). This assay was based on the variation of the  $Mg^{2+}$  concentration during the LAMP reaction to have a colorimetric change using hydroxynaphthol blue (HNB), a positive reaction is indicated by a color change from violet to sky blue. The LAMP reaction was carried out in a time of 30 minutes, had an analytical sensitivity of 100 copies of DNA and no cross-reactivity with *T. equiperdum*. LAMP and PCR techniques were used for the detection of *Trypanosoma spp.* in 19 field samples from the García Moreno parish, Orellana. The detection of the *Trypanozoon* subgenus was carried out by PCR, using the ESAG 6/7 primers, obtaining a prevalence of 68.42% (13/19), the detection of *T. evansi* was carried out using LAMP RoTat 1.2 VSG and to compare validity of the results, PCR was performed for the same target gene. These tests revealed 4 coincident results, 1 positive for LAMP and negative for PCR, and 1 positive for PCR and negative for LAMP, obtaining a prevalence for both techniques of 26.32% (5/19). These results suggest the presence of subgenus *Trypanozoon* in the domestic animals of the García Moreno parish and indicate a

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

potential risk for all the animals present in the area. Therefore, it is necessary to implement epidemiological and diagnostic studies that increase the level of precision and number of samples.

**Key words:**

*Trypanosoma spp.*, *Trypanozoon*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, HNB, LAMP, PCR

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

## Introducción

Los tripanosomas son parásitos protozoarios causantes de enfermedades llamadas tripanosomosis (Desquesnes, 2004). La tripanosomosis de ganado, causada por las especies *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), *Trypanosoma equiperdum* (*T. equiperdum*) y *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*); pertenecientes al subgénero *Trypanozoon*, tiene un impacto socioeconómico significativo y limita la productividad animal en todo el mundo. Una característica distintiva clave en estas especies es que *T. evansi* y *T. equiperdum* sufrieron alteraciones en su ADN de cinetoplasto que les impide adoptar la forma procíclica en las moscas tsetse, estas especies ya no pueden realizar su ciclo en *Glossina*. Por otro lado, *T. brucei* puede tener el desarrollo procíclico en las moscas tsetse (Desquesnes et al., 2013) y es responsable de la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), una enfermedad protozoaria endémica que afecta a muchos países africanos (Hayashida et al., 2015), mientras *T. evansi* y *T. equiperdum* son causantes de tripanosomosis en América Central y del Sur (Desquesnes, 2004).

El hemoparásito *T. evansi* se transmite principalmente de forma mecánica por moscas hematófagas del género *Stomoxys* y *Tabanus* (Hoare C.A., 1972), causando una enfermedad debilitante del ganado comúnmente llamada "Mal de caderas" en Brasil, "Murrina" en América Central, y "Derrengadera" en Venezuela (Desquesnes, 2004). La presencia de este tripanosomátido se ha descrito en 7 países de América del Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana, Perú y Venezuela, afectando a una gran diversidad de hospedadores mamíferos, incluidos animales domésticos, silvestres e incluso especies en peligro de extinción (Aregawi et al., 2019). Los hospedadores susceptibles están constituidos por los caballos, asnos y burros, gatos, perros y búfalos. Los murciélagos vampiro (*Desmodus rotundus*) son simultáneamente hospedadores, reservorios y vectores (Desquesnes, 2004).

Por otra parte, *T. equiperdum*, responsable de la durina o "mal de coit", causa una

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

enfermedad crónica en caballos, que ha sido esporádica en América, desde Chile hasta Canadá. Su principal medio de transmisión es a través de las mucosas genitales durante el coito, pero también puede atravesar las membranas mucosas de los ojos y la nariz. También se ha comprobado la transmisión a través de insectos hematófagos, pero la parasitemia es de muy corta duración (Desquenes, 2004).

En comparación con las tripanosomosis animales transmitidas por la mosca tsetse, se presta poca atención a la epidemiología y el control de la tripanosomosis en América del Sur, siendo rara vez notificada la presencia de *T. evansi* o *T. equiperdum*. Esta situación puede estar relacionada al desconocimiento de su impacto económico, la naturaleza generalmente crónica de la enfermedad, o que los países se abstengan de informar por temor a las consecuencias para el sector pecuario (Aregawi et al., 2019). Por esta razón, el control de la tripanosomosis depende de una prueba diagnóstica sensible y precisa, y un tratamiento eficaz especialmente en áreas con infecciones crónicas, para prevenir la reaparición de la enfermedad debido a brotes imprevistos (Tong et al., 2018).

Existen varias técnicas para detectar tripanosomas. Tradicionalmente se usan técnicas parasitológicas, las cuales comprenden la observación directa de parásitos (Ramírez-Iglesias et al., 2011), cuya efectividad está limitada por su baja sensibilidad analítica (parasitemia  $> 10^2$  parásitos/mL) (More et al., 2017). Mientras, una gran proporción de infecciones son crónicas y no desarrollan niveles detectables de parasitemia (Ramírez-Iglesias et al., 2011). Las pruebas de detección de anticuerpos se utilizan en un tamizaje previo, pero son incapaces de distinguir las infecciones actuales de las pasadas, por lo que, no pueden usarse como prueba de curación (Tong et al., 2018), y pueden ser negativas en animales que aún se encuentran en período de incubación (Ramírez-Iglesias et al., 2011). Las técnicas moleculares, se caracterizan por ser específicas y altamente sensibles (Ferrer, 2015), siendo aplicables en la fase crónica y en el

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

período de prepatencia de la enfermedad (Ramírez-Iglesias et al., 2011). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido utilizada para la detección de tripanosomas como apoyo al diagnóstico de la tripanosomosis, presentando una alta sensibilidad, además de tener la ventaja de especificidad de especie (Desquenes, 2004). Desafortunadamente, las zonas geográficas afectadas por la tripanosomosis son, en su mayoría, países en desarrollo donde la infraestructura y los recursos de laboratorio son a menudo limitados (Salim et al., 2018), mientras la PCR requiere equipos relativamente frágiles y costosos (Tong et al., 2018).

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), descrita por Notomi et al. (2000), es una novedosa técnica de amplificación de genes de autociclado y desplazamiento de hebra, que permite la amplificación de unas pocas copias de ADN a  $10^9$  copias en menos de 1 hora (Notomi et al., 2000). LAMP se muestra como una técnica más sensible y específica que la PCR, además se lleva a cabo a temperatura constante. El método más simple y rentable para determinar una reacción LAMP negativa o positiva es la detección de turbidez a simple vista, aunque este método requiere cierta habilidad para evaluar el resultado. El uso de Azul de Hidroxinaftol (HNB) como indicador de reacción LAMP descrito por Goto et al. (2009), es un ensayo colorimétrico más simple para la detección y es colocado antes que se lleve a cabo la reacción LAMP (Goto et al., 2009). LAMP se utiliza cada vez más como prueba rápida de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Njiru et al., 2010; Tong et al., 2018), siendo una técnica conveniente para usarla en campo, particularmente en áreas donde la incidencia de infección se ha vuelto extremadamente baja. Por esto, podría usarse como una herramienta para el control de la tripanosomosis en áreas donde las infecciones están causando una amenaza para animales de interés pecuario (Tong et al., 2018). En América Latina la técnica LAMP se ha utilizado para el diagnóstico de enfermedades causadas por *T. cruzi* y *T. rangeli* en el estudio de Quispe et al.

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

(2014), y la detección de *T. cruzi* en el estudio de Besuschio et al. (2017). También hay estudios para la detección de *T. vivax* en Brasil, donde LAMP ha demostrado ser una herramienta más útil que la PCR (Cadioli et al., 2015; Castilho Neto et al., 2021).

En la actualidad *T. evansi* se ha reportado en países cercanos a la Amazonía ecuatoriana como es el caso de Bolivia, Brasil, Perú, Venezuela y Colombia, pero muy pocos datos recientes están disponibles. Mientras que sobre *T. equiperdum* se desconoce la distribución, siendo a veces confundido clínicamente con *T. evansi* (Desquesnes, 2004). Por lo cual, se puede suponer que *T. evansi* y *T. equiperdum* tenga una prevalencia en el territorio ecuatoriano. Se han realizado pocos estudios en el Ecuador con respecto a la presencia de *Trypanosoma spp.*, entre los estudios de Chávez-Larrea et al. (2020), detectando *T. vivax* en bovinos por medio de PCR punto final y el estudio de Coello-Peralta et al. (2020), que fue el primer reporte de *Trypanosoma spp.* en ovinos en Ecuador. Son aún más escasos los estudios referentes al subgénero *Trypanozoon* en el Ecuador, a pesar de que, por su ubicación geográfica, la coexistencia de vectores, reservorios y hospedadores susceptibles favorece la interacción a lo largo de la cadena epidemiológica, facilitando su difusión (Cárdenas et al., 2009; Ramírez-Iglesias et al., 2016; Hinojosa Castillo, 2021). Por esta razón, es necesario realizar estudios epidemiológicos para un diagnóstico sensible y específico de tripanosomosis con el propósito de tomar las medidas sanitarias adecuadas para el control de la enfermedad y evitar pérdidas económicas (Ramírez-Iglesias et al., 2016). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue implementar técnicas de detección molecular como la LAMP para la detección de *Trypanosoma spp.* en animales de interés pecuario y proporcionar una visión regional de la epidemiología de la tripanosomosis causada por el subgénero *Trypanozoon* en la provincia de Orellana, Ecuador.

## **Materiales y Métodos**

### ***Estandarización de la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)***

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

La estandarización de la técnica LAMP se realizó con el fin de encontrar las condiciones que permitan obtener una mayor sensibilidad, amplificación y revelado. Para ello, se empleó ADN purificado de los aislados TeAp-ElFrío01 y TeAp-Mantecal01, clasificados como *T. evansi*, y el aislado TeAp-N/D1, clasificado como *T. equiperdum*, para las pruebas de sensibilidad y especificidad analítica. Estos 3 aislados fueron previamente caracterizados molecularmente por Sánchez et al. (2015).

El protocolo de LAMP fue realizado según lo descrito por Tong et al. (2018) y recomendaciones de las casas comerciales, basándonos en la generación de pirofosfato de magnesio generado durante la LAMP. Se emplearon un conjunto de seis cebadores para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG (**Tabla 1**) (Tong et al., 2018). Seguido se realizó el ensayo colorimétrico similar al realizado por Goto et al. (2009) con HNB para LAMP, como método de revelado, debido a la reducción de riesgos de contaminación y que se ha mostrado útil en la detección de ADN de alto rendimiento (Goto et al., 2009).

**Tabla 1.** Cebadores LAMP utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia
<b>F3</b>	GTAGGAAGCAACACCTGCG
<b>B3</b>	TTGATTAGTGCTGCGTGTGT
<b>FIP</b>	TGCGAGGTGCACCTTGATGTTGAAGCAATAACCGGCAACGAC
<b>BIP</b>	GAAGGCAAAGTTGACGACCAGCTGTGGTGTGCTTTTCCTTGT
<b>LF</b>	GCGATTTTGATCCCGCCG
<b>LB</b>	CAGAACGAGCAGAATTTTCCA

La reacción se realizó con 25  $\mu$ L de mezcla de reacción que contenía: 1  $\mu$ L de ADN (controles positivos TeAp-ElFrío01 o TeAp-Mantecal01), 1.6  $\mu$ M de FIP y BIP, 0.2  $\mu$ M de F3

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

y B3, 0.8  $\mu\text{M}$  de LF y LB, 1.4 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.32 U/ $\mu\text{L}$  del fragmento grande de ADN polimerasa Bsm (ThermoFisher), y 1X Isothermal Amplification Buffer Pack (New England Biolabs). Para establecer las condiciones óptimas del LAMP, se emplearon tres diferentes temperaturas de trabajo 60, 62.5 y 65 grados centígrados por 30 minutos; todas seguidas de una desnaturalización de 80 grados centígrados por 10 minutos. De igual forma, se probaron diferentes concentraciones de HNB sal trisódica (Baker Analyzed) y  $\text{MgSO}_4$  (New Enlgands BioLabs) en la reacción para determinar el mejor revelado utilizando: **Condición A:** 0.25mM de HNB y 6mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ; **Condición B:** 0.25mM de HNB y 8mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ; **Condición C:** 0.125mM de HNB y 6mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ; y **Condición D:** 0.125mM de HNB y 8mM de  $\text{Mg}^{2+}$ . Finalmente, se determinó la sensibilidad analítica del LAMP utilizando 12 diluciones seriadas a partir de un producto de PCR del gen diana cuya concentración de ADN se midió utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 de invitrogen, siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales. El cálculo del número de copias (cp) se realizó a partir de la concentración del amplicón del gen diana y el número de pares de bases empleando el sitio web <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

Los productos de amplificación por LAMP se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 50 min a 100v. Las mejores condiciones asociadas al límite de detección y revelado del LAMP, fueron seleccionadas para su aplicación empleando muestras de ADN de animales naturalmente infectados del oriente ecuatoriano.

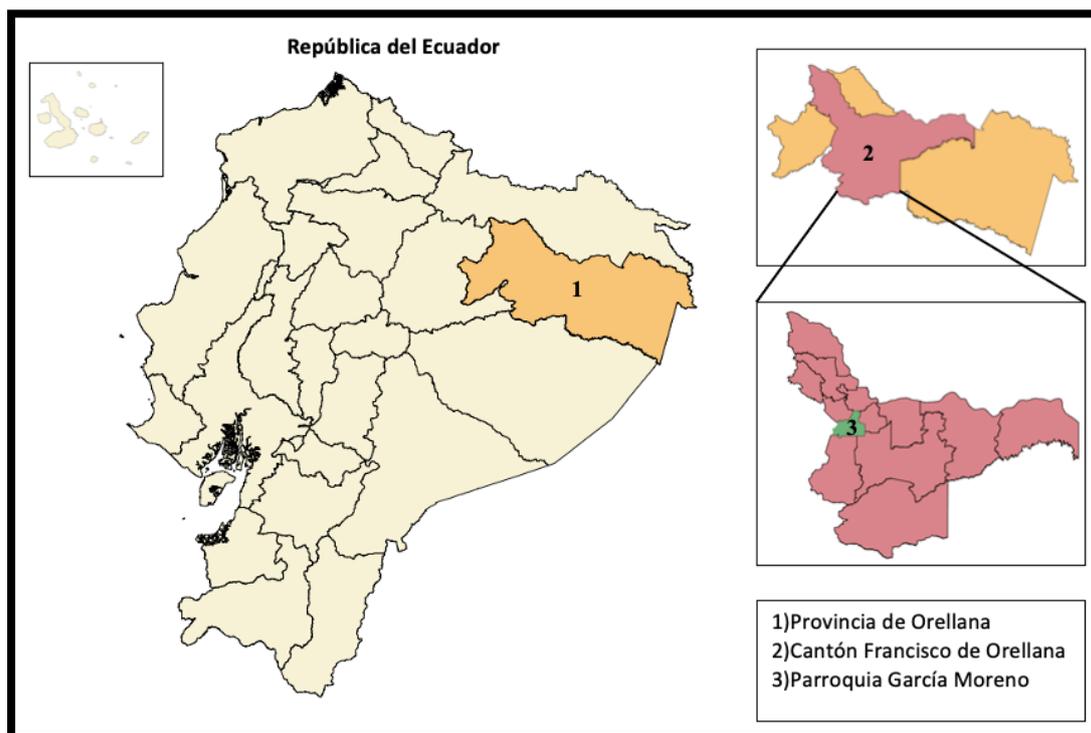
### ***Implementación de pruebas de detección molecular en muestras de campo***

El presente trabajo contó con el apoyo de la Universidad Central del Ecuador (UCE), quienes facilitaron 19 muestras de ADN purificado a partir de animales de interés pecuario, pertenecientes al proyecto “Artrópodos” realizado por el Instituto de Investigación en Salud

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

Pública y Zoonosis - CIZ de la UCE. Estas muestras provienen de animales de la parroquia García Moreno (0°31'34.8"S 77°01'01.5"W), cantón Francisco de Orellana, en la provincia de Orellana localizada al Noreste del Ecuador. La provincia de Orellana es una de las seis provincias que conforma el oriente ecuatoriano. La parroquia García Moreno cuenta con una superficie total de 131.719 Km<sup>2</sup> y sus límites geográficos son: al norte con el Barrio Flor de Oriente de la Zona Urbana de Puerto Francisco de Orellana y Río Napo, al sur con la parroquia la Belleza y Parroquia Dayuma, al este con la parroquia El Dorado, y al oeste con la parroquia San Luis de Armenia y Cantón Loreto.

**Figura 1. Origen de las muestras biológicas.** Procedencia de las muestras de campo analizadas por métodos de detección molecular en este estudio.



Se realizó la detección con muestras de campo utilizando el conjunto de cebadores ESAG 6/7 para amplificar genes multicopia que codifican para el complejo heterodimérico del receptor de transferrina (Kabiri & Steverding, 2001) (amplicón aproximado de 237 pb),

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

específicos para el subgénero *Trypanozoon* (Holland et al., 2001) y los cebadores para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG (amplicón aproximado de 295 pb), específicos para *T. evansi* tipo A (Tong et al., 2018) (**Tabla 2**). Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 25µL con 1µL de ADN y 12.5µL de Go Taq Master Mix (Promega™), empleando las concentraciones de cada cebador y los programas de ciclado de acuerdo a cada referencia correspondiente.

**Tabla 2.** Cebadores PCR utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia	Referencia
<b>TonF</b>	CAAACTAACAGCCGTTGCAGCG	(Tong et al., 2018)
<b>TonR</b>	AGTTCCGGTACCTTCTCCATTTC	(Tong et al., 2018)
<b>ESAGF 6/7</b>	ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG	(Holland et al., 2001)
<b>ESAGR 6/7</b>	CACGTGAATCCTCAATTTTGT	(Holland et al., 2001)

Los productos de amplificación por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Safe view (abm®) (según indicaciones de la casa comercial), por 1h a 100v.

## ***Determinación de la prevalencia***

El porcentaje de prevalencia obtenido mediante la aplicación de PCR y LAMP, se calculó para este estudio a través de la fórmula representada en la Ecuación (1).

$$Prevalencia = \frac{\#de\ muestras\ positivas\ con\ la\ técnica}{\#total\ de\ muestras\ analizadas\ con\ la\ técnica} * 100\% \text{ (Ec. 1)}$$

## **Resultados**

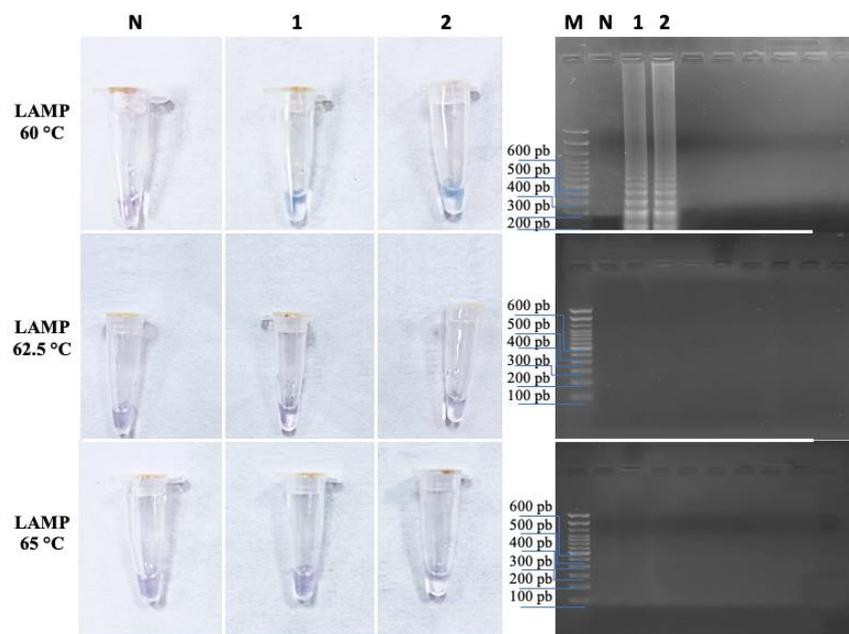
### ***Estandarización del LAMP***

Se empleó ADN purificado de los aislados TeAp-ElFrío01 y TeAp-Mantecal01, clasificados como *T. evansi*, para determinar la temperatura de la reacción y concentraciones

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

óptimas de HNB y  $Mg^{2+}$  para la reacción LAMP. En la Figura 2 se muestran los diferentes productos de LAMP y sus respectivos geles de electroforesis al 1.5% de agarosa, utilizando los cebadores descritos por Tong et al. (2018) para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG a distintas temperaturas 60, 62.5 y 65 grados centígrados.

**Figura 2. Prueba de temperaturas de LAMP para la detección de *T. evansi*.** M: Marcador de 100 pares de bases, N: Control sin templado, 1: TeAp-Mantecal01, 2: TeAp-ElFrío01.



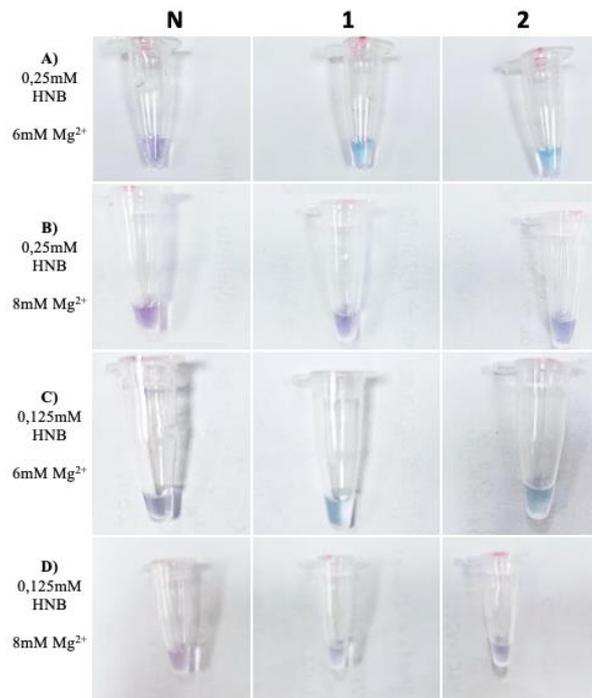
El color de HNB cambió de violeta a azul cielo después de la reacción LAMP a medida que la concentración de iones de  $Mg^{2+}$  libres disminuyó al formar pirofosfato de magnesio insoluble (Hayashida et al., 2015). Se puede observar un cambio de color y una amplificación satisfactoria, representada por el clásico patrón tipo “escalera” de amplicones de tamaños variables, en el ensayo de LAMP a 60 grados centígrados para TeAp-Mantecal01 y TeAp-ElFrío01. En el caso de las condiciones de LAMP a 62.5 y 65 grados centígrados se puede observar que no tuvieron cambio de color ni amplificación en el gel de agarosa.

Para determinar las concentraciones óptimas de revelado, el ensayo LAMP se probó utilizando diferentes concentraciones de HNB y  $Mg^{2+}$ . En la Figura 3 se muestran los diferentes

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

productos de LAMP con 4 concentraciones diferentes a una temperatura de 60 grados centígrados. Donde se evidencia que la **Condición A**, con 0.25mM de HNB y 6mM de  $Mg^{2+}$ , tiene un mejor revelado colorimétrico para la reacción positiva.

**Figura 3. Prueba de revelado de LAMP con distintas concentraciones de HNB y  $Mg^{2+}$ .** N: Control sin templado, 1: TeAp-Mantecal01, 2: TeAp-ElFrio01.

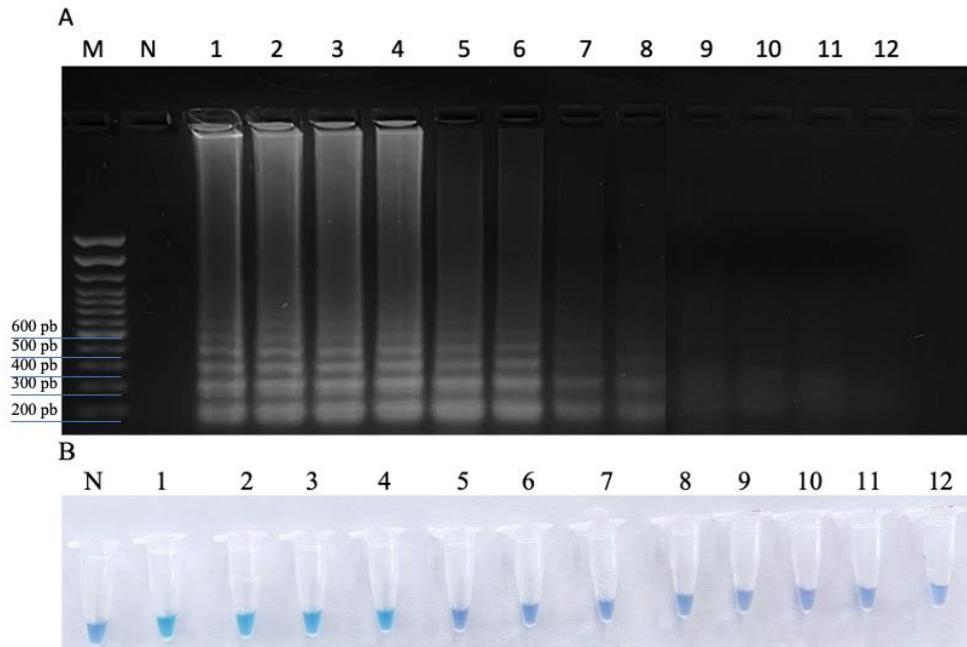


Se utilizó una dilución de un producto purificado de PCR del gen RoTat 1.2 VSG, para determinar la sensibilidad analítica del ensayo LAMP. Se utilizaron diluciones en serie, comenzando con una concentración de  $1 \times 10^{11}$  copias hasta 1 copia de ADN molde para el ensayo LAMP. El límite de detección del templado de ADN de *T. evansi* usando el ensayo LAMP fue de  $1 \times 10^2$  copias en el gel de electroforesis y  $1 \times 10^8$  copias por reacción para el ensayo colorimétrico (**Figura 4**).

**Figura 4. Prueba de sensibilidad de LAMP para la detección de *T. evansi*.** (A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de LAMP, (B) Productos de LAMP con HNB. M: Marcador de 100pb, N: Control sin templado, 1:  $1 \times 10^{11}$  cp, 2:  $1 \times 10^{10}$  cp, 3:  $1 \times 10^9$  cp, 4:  $1 \times 10^8$  cp, 5:  $1 \times 10^7$  cp, 6:  $1 \times 10^6$  cp, 7:  $1 \times 10^5$  cp, 8:  $1 \times 10^4$

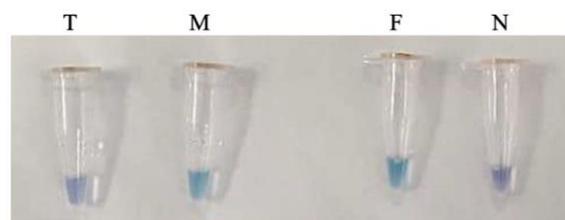
# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

cp, **9**:  $1 \times 10^3$  cp, **10**:  $1 \times 10^2$  cp, **11**: 10 cp, **12**: 1 cp.



Para determinar la especificidad analítica del ensayo LAMP, se empleó ADN del aislado TeAp-N/D1, identificado como *T. equiperdum*, un agente infeccioso perteneciente al mismo subgénero que *T. evansi*. Los resultados muestran que no hubo reacción cruzada o positividad con el ADN de TeAp-N/D1 (**Figura 5**). De igual forma, no se llegó a observar amplificaciones empleando como revelado gel de agarosa (resultados no mostrados).

**Figura 5. Prueba de especificidad de LAMP para detección de *T. evansi*.** T: TeAp-N/D1, M: TeAp-Mantecal01, F: TeAp-ElFrío01, N: Control sin templado.



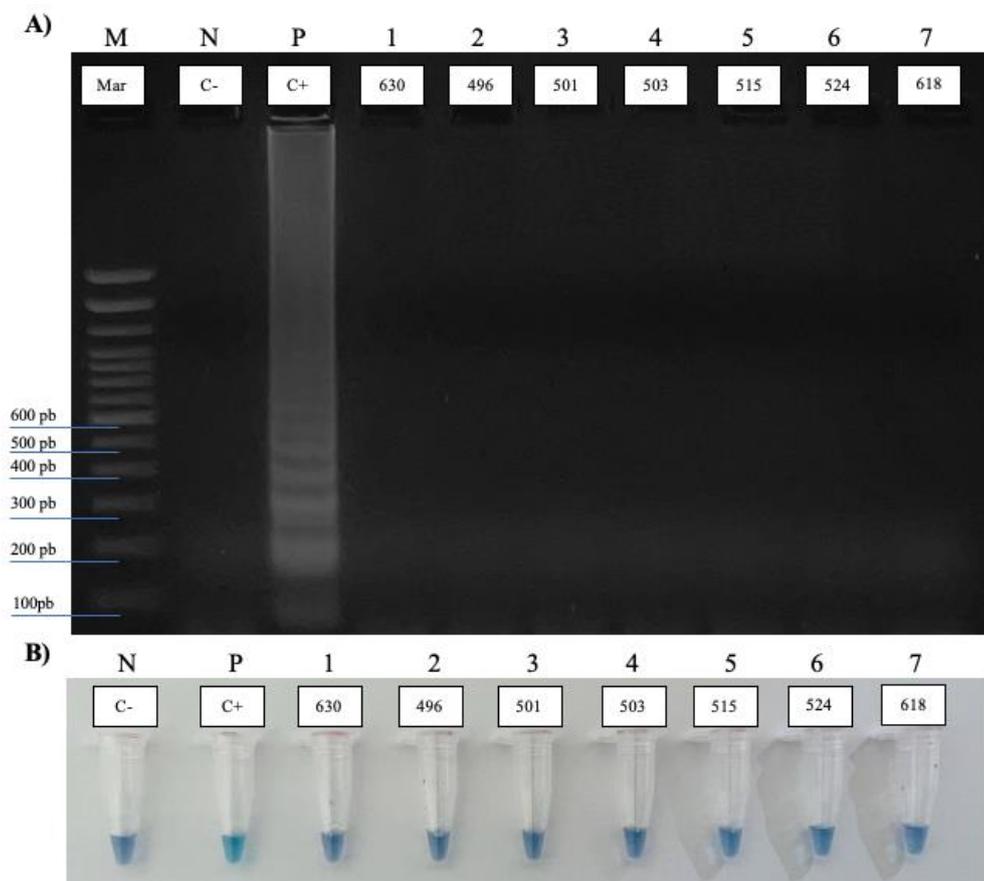
## **Resultados LAMP RoTat 1.2 VSG**

Posterior a determinar las condiciones óptimas de LAMP, con base en las diferentes pruebas analíticas de laboratorio, se procedió a realizar la implementación de la técnica para

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

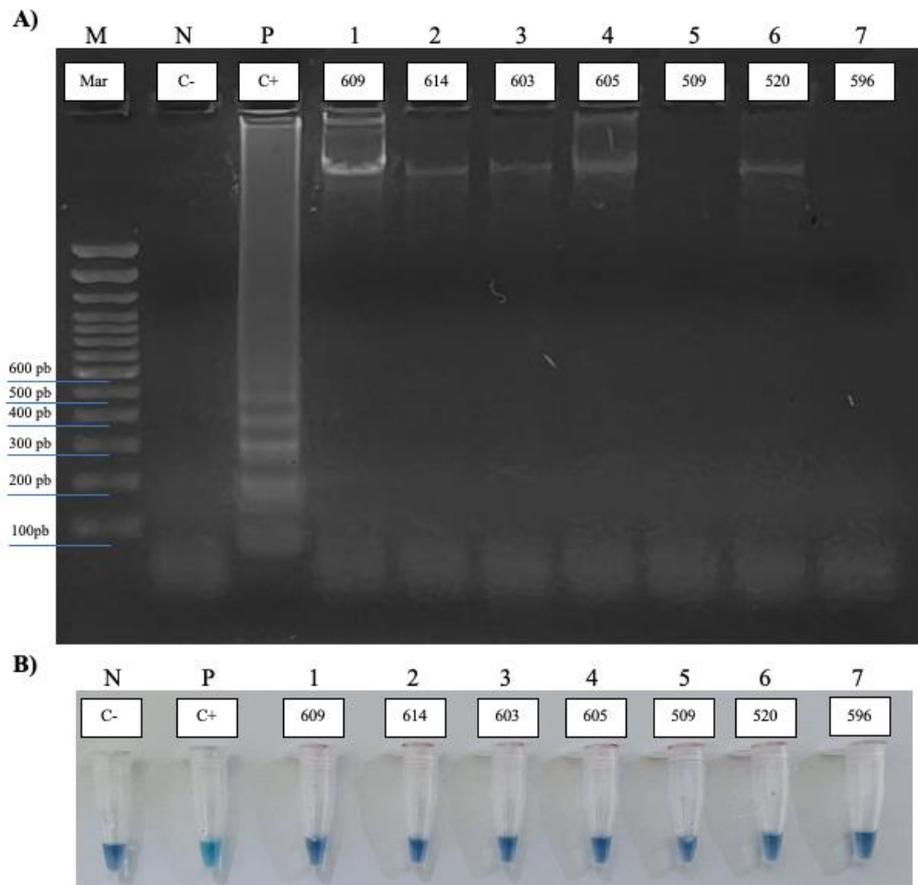
evaluar muestras de ADN de campo de diferentes hospedadores, procedentes de la provincia de Orellana. Se puede observar que las muestras de las figuras 6 y 7 no tuvieron amplificación en el gel de electroforesis, y no muestran un cambio de color al característico azul cielo de la reacción positiva. Por otro lado, se puede observar una amplificación satisfactoria, con un barrido o patrón tipo Ladder detectado en el gel, así como un cambio de coloración, para las muestras de campo 517, 627, 608, 545, 485 (**Figura 8**). En total, de las 19 muestras evaluadas por LAMP se obtuvieron 5 muestras positivas, correspondiente a una prevalencia general de tripanosomosis causada por *T. evansi* del 26.32% (5/19) en la provincia de Orellana.

**Figura 6. Productos de LAMP RoTat 1.2 VSG para la detección de *T. evansi* en muestras de campo. (A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de LAMP, **(B)** Productos de LAMP con HNB. **M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-7:** Muestras de campo.



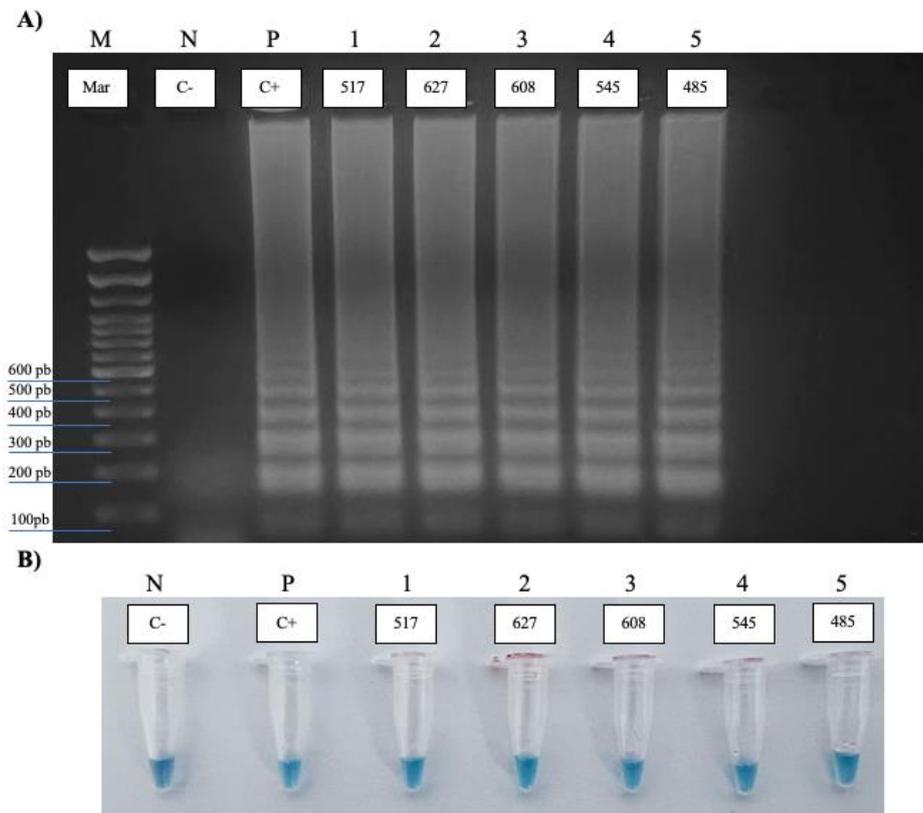
IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**Figura 7. Productos de LAMP RoTat 1.2 VSG para la detección de *T. evansi* en muestras de campo. (A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de LAMP, **(B)** Productos de LAMP con HNB. **M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-7:** Muestras de campo.



**Figura 8. Productos de LAMP RoTat 1.2 VSG para la detección de *T. evansi* en muestras de campo. (A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de LAMP, **(B)** Productos de LAMP con HNB. **M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-5:** Muestras de campo.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

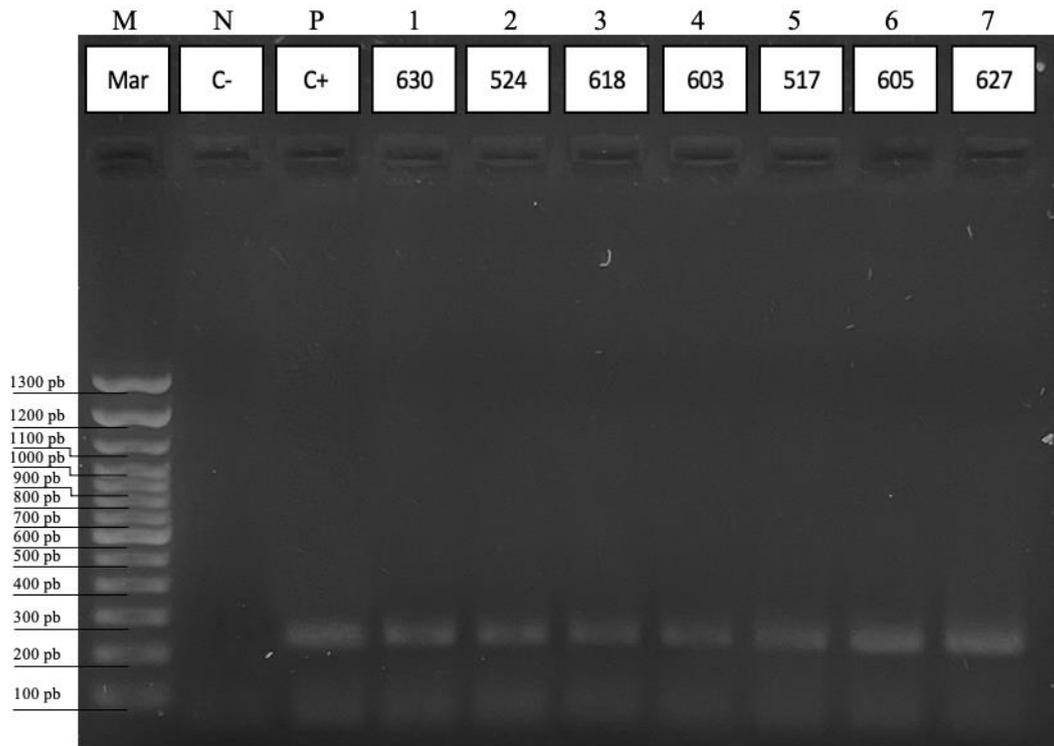


**Resultados PCR ESAG 6/7 y RoTat 1.2 VSG**

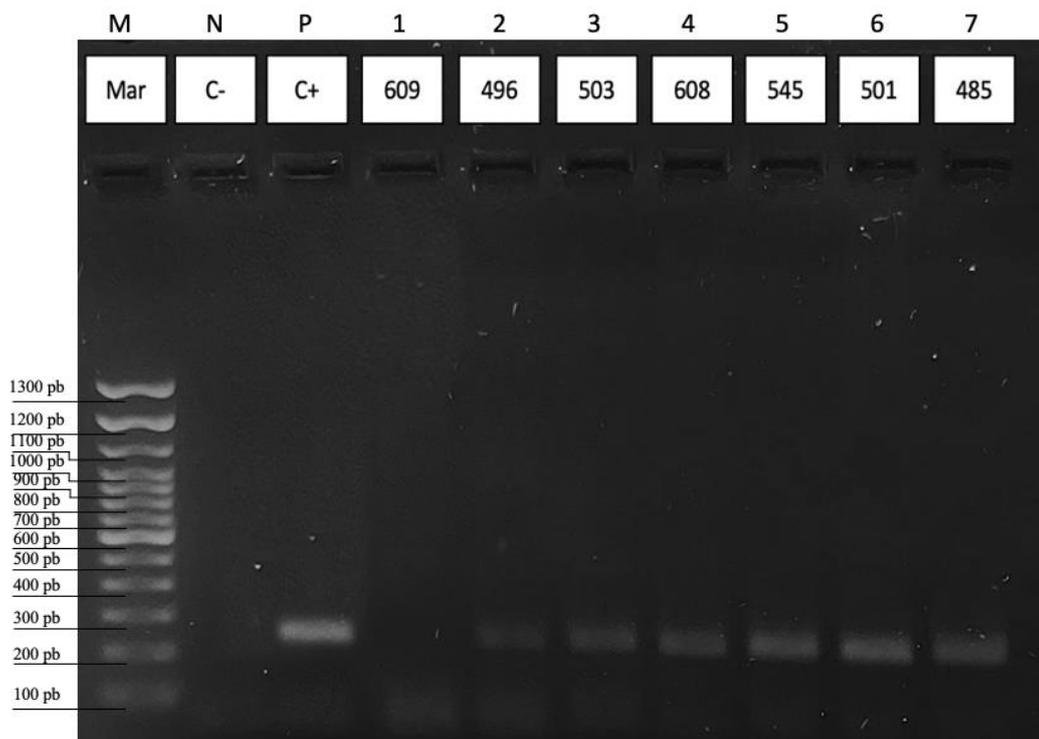
Con la intención de comparar el desempeño de detección de las muestras de campo del ensayo LAMP con el método convencional de amplificación de ácidos nucleicos punto final, se procedió a ejecutar la PCR empleando cebadores tanto subgénero como especie específicos. Se puede observar una amplificación satisfactoria con una banda entre 200 y 300 pb para 13 muestras de campo de las 19 muestras evaluadas, empleando los cebadores ESAG 6/7 (**Figura 9, 10 y 11**). La prueba utilizando estos oligos resultó en una prevalencia general de tripanosomosis causada por el subgénero *Trypanozoon* del 68.42% (13/19).

**Figura 9. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR con cebadores ESAG 6/7 de las muestras de campo.** M: Marcador de 100 pb, N: Control sin templado, P: Dilución de un producto de PCR obtenido con los cebadores ESAG 6/7 a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, 1-7: Muestras de campo.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

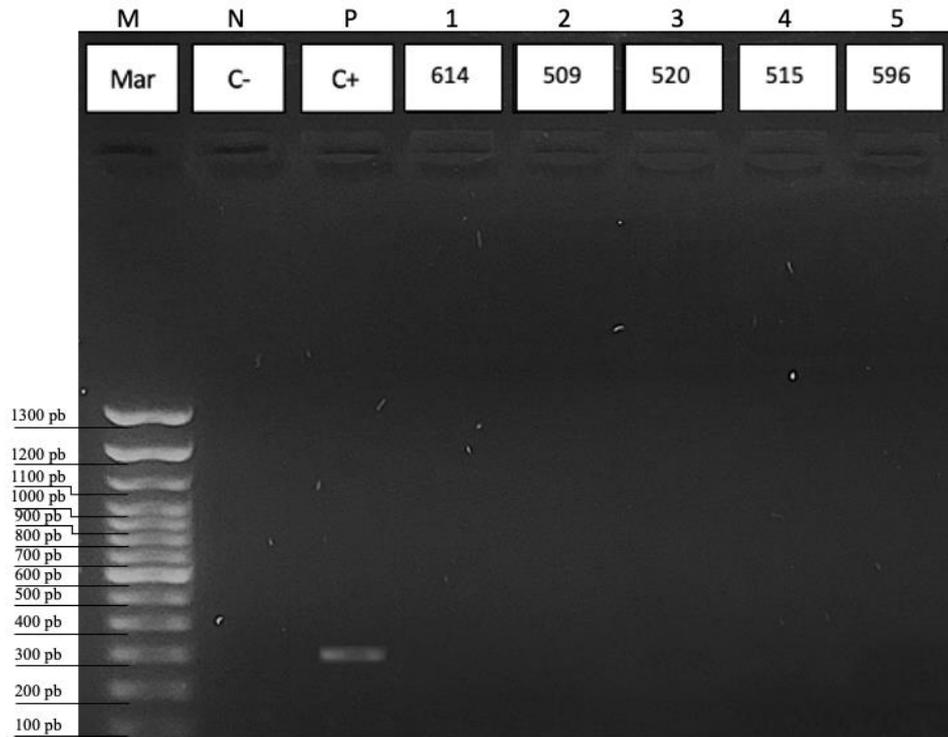


**Figura 10. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR con cebadores ESAG 6/7 de las muestras de campo. M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR obtenido con los cebadores ESAG 6/7 a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-7:** Muestras de campo.



IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

**Figura 11. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR con cebadores ESAG 6/7 de las muestras de campo. M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR obtenido con los cebadores ESAG 6/7 a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-5:** Muestras de campo.



De forma similar, se llevaron a cabo las amplificaciones del gen RoTat 1.2 VSG, a partir de las muestras de campo. Se puede observar amplicones con tamaños entre 200 y 300 pb para las muestras de campo: 524, 517, 627, 545, 485 (**Figura 12 y 13**). Correspondiente a una prevalencia general de tripanosomosis causada por *T. evansi* del 26.32% (5/19).

**Figura 12. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR con cebadores para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG de las muestras de campo. M:** Marcador de 100 pb, **N:** Control sin templado, **P:** Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-7:** Muestras de campo.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

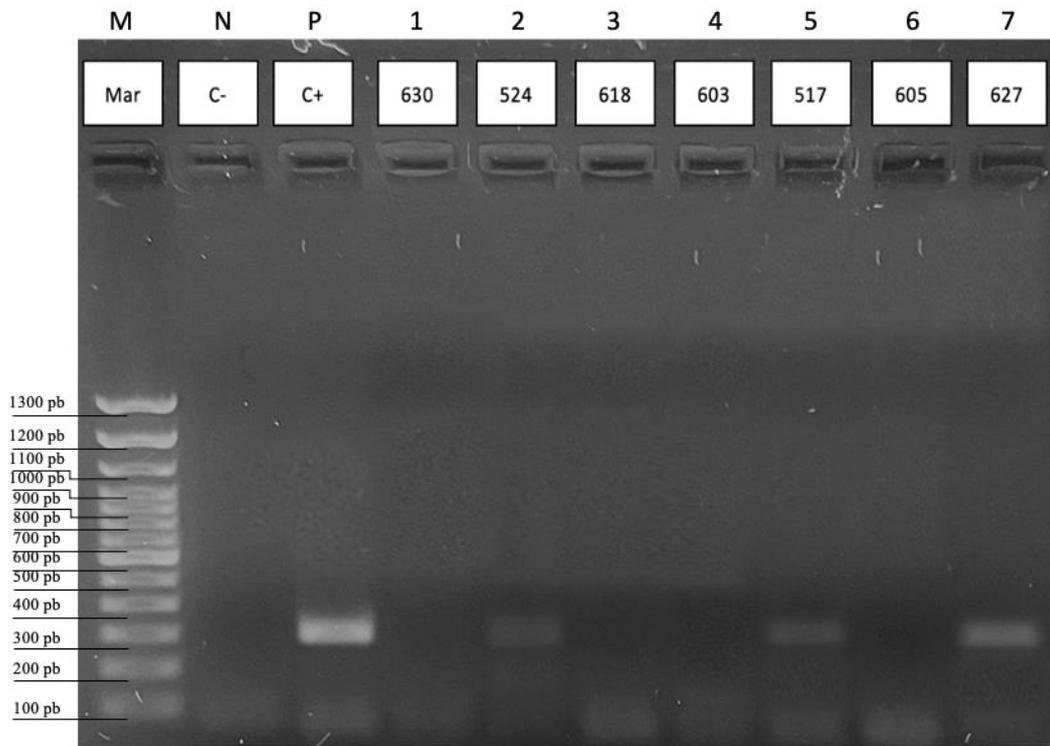
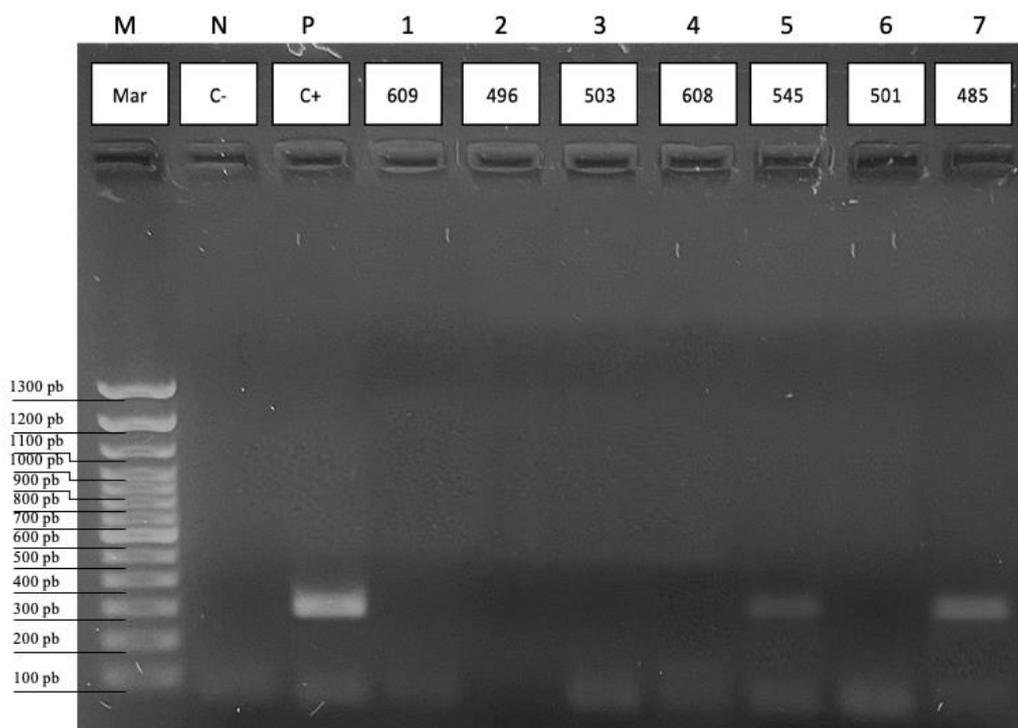


Figura 13. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR con cebadores para amplificar el gen **RoTat 1.2 VSG** de las muestras de campo. **M**: Marcador de 100 pb, **N**: Control sin templado, **P**: Dilución de un producto de PCR del gen RoTat 1.2 VSG a partir de ADN del aislado TeAp-Mantecal01, **1-7**: Muestras de campo.



IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

La tabla 3 jerarquiza los resultados obtenidos de los ensayos por PCR y LAMP para la tripanosomosis en los animales de interés pecuario de la provincia de Orellana. En lo que respecta a la especie, se obtuvo un porcentaje de detección del 83.33% (n = 5/6) para las muestras de caninos, del 71.43% (n = 5/7) para equinos y del 50% (n = 3/6) para bovinos, detectados por los cebadores ESAG 6/7. En el ensayo de PCR realizado con los cebadores para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG se obtuvo prevalencias del 16.67% (n = 1/6) para las muestras de caninos, del 42.86% (n = 3/7) para equinos y del 16.67% (n = 1/6) para bovinos. Por otro lado, el ensayo de LAMP realizado con los cebadores para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG se obtuvo prevalencias del 16.67% (n = 1/6) para las muestras de caninos, del 42.86% (n = 3/7) para equinos y del 16.67% (n = 1/6) para bovinos.

**Tabla 3.** Resultados de ensayos PCR y LAMP para la detección de *Trypanosoma spp.*

<b>PCR Cebadores ESAG 6/7</b>				
<b>Especie</b>	<b>n</b>	<b>Negativos</b>	<b>Positivos</b>	<b>Prevalencia%</b>
<b>Caninos</b>	6	1	5	83.33
<b>Equinos</b>	7	2	5	71.43
<b>Bovinos</b>	6	3	3	50
<b>Total</b>	19	6	13	68.42
<b>PCR Cebadores para RoTat 1.2 VSG</b>				
<b>Especie</b>	<b>n</b>	<b>Negativos</b>	<b>Positivos</b>	<b>Prevalencia%</b>
<b>Caninos</b>	6	5	1	16.67
<b>Equinos</b>	7	4	3	42.86
<b>Bovinos</b>	6	5	1	16.67
<b>Total</b>	19	14	5	26.32

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

<b>LAMP Cebadores para RoTat 1.2 VSG</b>				
<b>Especie</b>	<b>n</b>	<b>Negativos</b>	<b>Positivos</b>	<b>Prevalencia%</b>
<b>Caninos</b>	6	5	1	16.67
<b>Equinos</b>	7	4	3	42.86
<b>Bovinos</b>	6	5	1	16.67
<b>Total</b>	19	14	5	26.32

### **Discusión**

Se necesitan técnicas de detección rápidas y precisas para la prevención y control de la tripanosomosis (Tong et al., 2018). Algunas técnicas son aplicables para la detección de tripanosomátidos como la observación directa del parásito, pruebas de antígeno, pruebas de anticuerpos y/o técnicas moleculares como la PCR (Ramírez- Iglesias et al., 2011), siendo las más específicas y sensibles las técnicas moleculares (Ferrer, 2015). Sin embargo, la mayoría de estas técnicas requieren equipos y procesos relativamente frágiles y costosos. La LAMP, por otro lado, es una técnica molecular caracterizada por una alta sensibilidad y especificidad, y puede aplicarse para la detección molecular en condiciones de recursos limitados, puesto que, no requiere dispositivos costosos o especializados como termocicladores (Hayashida et al., 2015).

En el estudio actual, que se enfoca en la amenaza de *Trypanosoma spp.* en el territorio ecuatoriano, se llevó a cabo la aplicación de la técnica molecular PCR para detectar el subgénero *Trypanozoon* y la especie *T. evansi*, y la estandarización de la técnica LAMP en el laboratorio para la detección de *T. evansi*, en muestras de animales de interés pecuario pertenecientes a la provincia Orellana. Con el fin de brindar una técnica molecular rápida,

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

específica y aplicable en campo para proporcionar datos sobre la tripanosomosis en el Oriente ecuatoriano.

Con respecto a la tripanosomosis por *T. evansi*, hay dos serotipos principales, tipo A y tipo B, que se consideran un riesgo establecido para la salud del ganado (Tong et al., 2018). La estandarización del LAMP se realizó en el laboratorio, utilizando como base el protocolo descrito por Tong et al. (2018), para detectar *T. evansi* tipo A, con algunas modificaciones en los reactivos y el método de revelado utilizado. Por esta razón se establecieron condiciones óptimas de temperatura, tiempo, y concentraciones de HNB y  $Mg^{2+}$  en la reacción, para otorgar confiabilidad a los resultados preliminares que se obtienen en el presente trabajo y aumentar la especificidad. El primer parámetro probado fue la temperatura. El estudio de Notomi et al. (2000) menciona que la temperatura de la técnica LAMP puede estar entre 60 y 65 grados centígrados. El protocolo desarrollado por Tong et al. (2018), utiliza una temperatura de reacción de 65 grados centígrados. Sin embargo, la ADN polimerasa Bsm (ThermoFisher), que fue utilizada en este estudio, trabaja mayormente a 60 grados (Thermo Fisher Scientific, 2020). Por estas razones se probó un gradiente de temperaturas de 60, 62.5 y 65 grados centígrados, para evaluar el desempeño del ensayo y la polimerasa a diferentes temperaturas. El resultado obtenido fue que la reacción se llevaba a cabo de manera óptima a 60 grados, mientras esta no generaba amplificación a 62.5 ni a 65 grados centígrados. De igual manera, se efectuaron pruebas del tiempo de la reacción, en las cuales se estableció un ciclado de reacción de 30 minutos. Al probar la reacción por 60 minutos, aunque se lograba un mejor revelado colorimétrico, se generaban falsos positivos (resultados no mostrados). Esto puede ser debido a la posible descomposición térmica de los cebadores y/o otros reactivos (Jansson & Hedman, 2019) que ocasionó la formación de dímeros o multímeros de primers, que es una de las causas de reacciones no específicas en LAMP (Hayashida et al., 2015). En los estudios de Abbasi et

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

al. (2016), y de Hardinge y Murray (2019) se señala la generación de falsos positivos en las reacciones LAMP, después de un tiempo extendido de la reacción. Cabe mencionar que, la reacción LAMP original del estudio de Tong et al. (2018) se llevo a cabo en 30 minutos.

En cuanto al método de revelado se utilizó HNB como indicador del cambio de concentración de  $Mg^{2+}$ , siguiendo lo informado por Goto et al. (2009) estudio donde la concentración óptima fue de 0.12mM de HNB y 8mM de  $Mg^{2+}$ . El ensayo LAMP con HNB tiene varios beneficios porque no es necesario abrir el tubo posterior a la reacción para determinar si la reacción es positiva o negativa (esto reduce el riesgo de contaminación), puesto que, el cambio de color de HNB de violeta a azul cielo que indica una reacción positiva puede juzgarse fácilmente a simple vista (Goto et al., 2009), aunque con un nivel de subjetividad dependiente de cada observador. Las concentraciones con mejor desempeño y revelado colorimétrico en este estudio fueron de 0.25mM de HNB y 6mM de  $Mg^{2+}$  total de la reacción. A pesar de que el estudio de Goto et al. (2009) menciona que es posible usar 6mM de  $Mg^{2+}$  junto con el HNB, las concentraciones finales para LAMP no coinciden con su estudio. Esto puede deberse a una diferencia con los reactivos utilizados, que la mayoría de los protocolos utilizan la Bst DNA polimerasa a una temperatura mayor a 60 grados centígrados o que al momento de utilizar HNB como método de revelado tienen un tiempo mayor a 30 minutos para la reacción (Goto et al., 2009; Chahar et al., 2019; Zaczek-Moczydłowska et al., 2020). Por otro lado, el estudio de Quispe et al. (2014) recomienda el uso de una concentración mayor a 0.12mM de HNB para un mejor revelado colorimétrico. Es importante destacar que hay dos tipos de HNB que se utilizan para valoraciones de pH de metales, la sal disódica de azul de hidroxinaftol y la sal trisódica de azul de hidroxinaftol. Ambos reactivos vienen en forma de polvo seco, sin embargo, existen reportes que indican que la forma disódica no genera una coloración adecuada, por lo cual no muestra un cambio de color tras la reacción LAMP. Esto

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

puede ser debido a la naturaleza misma del reactivo (Vienna Biocenter 2020, 2021).

El método de revelado colorimétrico con HNB, solo se muestra efectivo ante una amplificación fuerte y números de copias elevado, como se da hasta la concentración de  $1 \times 10^8$  copias de ADN. Por otra parte, para las concentraciones desde  $1 \times 10^7$  copias hasta  $1 \times 10^2$  copias de ADN se puede observar amplificación en el gel y tomar como positivas. Esto indica que, en nuestro estudio, el revelado colorimétrico es menos efectivo. Esto puede deberse a varias razones como el cambio de temperatura en comparación con la reacción original, una diferencia en los reactivos utilizados o los cambios de concentraciones en el HNB y  $Mg^{2+}$ . Para el ensayo de sensibilidad analítica se puede observar una reacción positiva hasta con  $1 \times 10^2$  copias de ADN (equivalente a 0.042 fg/uL) en el gel de electroforesis. La sensibilidad del ensayo LAMP *in vitro* es de 1 pg de ADN total y hasta 100 veces mayor que la de los métodos basados en PCR (Kuboki et al., 2003), y de 160 cp/tubo utilizando HNB (Goto et al., 2009). Por lo cual, la sensibilidad obtenida, es adecuada para la técnica de LAMP, con un desempeño de sensibilidad analítica comparable a los trabajos de Salim et al. (2018), Tong et al. (2018) y Zaczek-Moczyłowska et al. (2020). De igual forma, se evaluó la especificidad de LAMP la cual no presentó reactividad cruzada con el aislado de *T. equiperdum* TeAp-N/D1, especie de relevancia epidemiológica en regiones subtropicales y que forma parte del mismo subgénero que *T. evansi*. La especificidad del LAMP para la secuencia diana de *T. evansi* está asociada a que la técnica requiere cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas en el ADN objetivo (Goto et al., 2009), el cual se encuentra de forma específica en *T. evansi*.

No se ha hecho mayores esfuerzos para determinar o controlar la prevalencia de tripanosomosis en el oriente ecuatoriano. Esta es exactamente la razón por la cual el desarrollo de ensayos de detección más sensibles y específicos es de suma importancia y se requieren para la futura vigilancia de campo y las estrategias que apuntan a prevenir la propagación de

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

enfermedades. En este estudio se realizó la detección de *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) por PCR con los cebadores ESAG 6/7, a partir de 19 muestras de animales de interés pecuario 13 muestras dieron positivo, obteniendo una prevalencia del 68.42% en la parroquia García Moreno, Orellana. Se presentó una prevalencia mayor en caninos del 83.33% (5/6), seguida de la prevalencia en equinos del 71.43% (5/7), y bovinos con una prevalencia del 50% (3/6). Es importante destacar que, los cebadores ESAG 6/7 no permiten la diferenciación específica entre las especies que conforman el subgénero *Trypanozoon*. *T. brucei* se encuentra exclusivamente en el África subsahariana (Steinmann et al., 2015; Schmidt et al., 2017), y no existe la presencia de esta especie en América Latina. Por lo cual, las muestras positivas posiblemente se deban al ADN genómico de *T. evansi* o *T. equiperdum*.

Para la detección de *T. evansi*, el ADN extraído de 19 animales de interés pecuario fue sometido tanto a PCR como al LAMP, para amplificar el gen RoTat 1.2 VSG. Estos ensayos revelaron 4 resultados positivos coincidentes en las muestras: 517, 485, 545, 627; más 1 positivo por LAMP, pero negativo por PCR en la muestra 608; y 1 positivo por PCR, pero negativo por LAMP en la muestra 524. Tras la realización de PCR y LAMP para RoTat 1.2 VSG se obtuvo una prevalencia del 26.32% en ambos ensayos. Las muestras no coincidentes en estos ensayos correspondían a equinos, por lo que, la prevalencia por especie se mantuvo en ambos ensayos, mostrando una prevalencia mayor en equinos de 42.86% (3/7), la prevalencia en caninos fue de 16.67% (1/6), la prevalencia de bovinos fue del 16.67% (1/6). Mostrando que los equinos de la parroquia García Moreno tienen una alta prevalencia de la especie *T. evansi*. La técnica LAMP tuvo un rendimiento comparable a la PCR en términos de sensibilidad en un tiempo menor. La no detección de la muestra por LAMP y positiva por PCR podría atribuirse en parte a las mutaciones en las regiones objetivo, ya que los cebadores LAMP hibridan mayor cantidad de regiones en comparación con los cebadores de PCR y, por lo tanto, las posibilidades

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

de tener los desajustes en las regiones diana son, en consecuencia, mayores en LAMP en comparación con PCR (Salim et al., 2018). Por otro lado, la no detección de la muestra por PCR y positiva por LAMP podría atribuirse a la mayor sensibilidad de la técnica LAMP. En cuanto al revelado colorimétrico en muestras de campo, todas las reacciones positivas por LAMP mostraron un color azul cielo característico, mientras las reacciones negativas presentaron un tono violeta.

Los resultados alcanzados en este estudio demuestran una alta prevalencia del subgénero *Trypanozoon* y la especie *T. evansi* en las muestras de ADN de los animales de interés pecuario evaluados de la parroquia García Moreno, y que el área se encuentra expuesta a este agente infeccioso, siendo un factor de riesgo para los animales que habitan en esa zona. Cabe mencionar que, todas las muestras que dieron positivo tanto para PCR y LAMP para el gen RoTat 1.2 VSG dieron positivo con los cebadores ESAG 6/7 previamente. La mayor detección de muestras positivas por parte de los cebadores ESAG 6/7 puede deberse a que amplifican una región altamente conservada como son los genes multicopia que codifican para el complejo heterodimérico del receptor de transferrina, (Kabiri & Steverding, 2001), o a que se trate de la detección del ADN de *T. equiperdum*, por lo que se deben emplear cebadores especie específicos adicionales junto con secuenciación para confirmar esta hipótesis.

La provincia de Orellana evaluada en este estudio tiene facilidad y cercanía para el intercambio comercial de animales con localidades de las naciones contiguas de Colombia y Perú. En Colombia el estudio de Zapata et al. (2009) muestra una detección de *Trypanosoma spp.* del 13.4% (28/209) en búfalos de agua de Barrancabermeja; el estudio de Jaimes-Dueñez et al. (2019) muestra una seroprevalencia de anticuerpos IgG de anti-*T. evansi* del 59.7% (424/710) y detección de *T. evansi* por PCR del 6.9% (49/710) en bovinos de los departamentos de Antioquia y Arauca. En Perú el estudio de Mekata et al. (2009) muestra una prevalencia de

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

*T. vivax* del 3.8% (4/104) y de *T. evansi* del 5.8% (6/104) por PCR en bovinos de Lima, y la presencia de *T. evansi* del 2.6% (5/195) por PCR en bovinos de Pucallpa. En Venezuela el estudio de Bethencourt et al. (2013) muestra una seroprevalencia por *Trypanosoma spp.* del 45.56% (82/180) en búfalos de agua en el estado de Cojedes; el estudio de J. R. Ramírez-Iglesias et al. (2016) muestra una prevalencia de *T. vivax* del 23.4% (11/47) y de *T. evansi* del 10.64% (5/47) por PCR en bovinos del estado de Miranda, y una prevalencia de *T. evansi* del 50% (19/38) por PCR en bovinos del estado de Aragua. En Brasil el estudio de Franke et al. (1994) muestra una seroprevalencia para *T. evansi* del 13.2% para 364 muestras de equinos, 4.7% para 306 muestras de bovinos, 30% para 70 muestras de caninos, y 24% para 50 muestras de capibaras del estado de Mato Grosso.

La prevalencia obtenida en este estudio es mayor al compararlo con otros estudios en el país. Entre algunos trabajos realizados en Ecuador se puede mencionar el primer reporte mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta realizado por Wells et al. (1977), con una seroprevalencia del 22.5% para *T. vivax* de 310 sueros de bovinos evaluados a nivel nacional; el trabajo de Medina-Naranjo et al. (2017) con una seroprevalencia del 31.03% para *Trypanosoma spp.* de 58 muestras de bovinos, evaluadas por ELISAI, de la provincia de Pastaza; el trabajo de Coello-Peralta et al. (2020) con el 2% de positivos para *Trypanosoma spp.* de 100 muestras de ovinos evaluadas de la provincia del Guayas; el trabajo de Burgos (2021) con una seroprevalencia del 8% para *Trypanosoma spp.* de 100 muestras de bovinos, evaluadas por ELISAI, de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas; y el trabajo de Hinojosa Castillo (2021) con una seroprevalencia del 6.82% para *Trypanosoma spp.* de 44 muestras de bovinos, evaluadas por ELISAI, de la provincia de Napo, 22.22% de 18 muestras de bovinos evaluadas de la provincia de Orellana y de 24.44% de 45 muestras de bovinos evaluadas de la provincia de Sucumbíos. La alta prevalencia de *Trypanozoon* mostrada en este

# IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

estudio puede deberse a la recolección de muestras en una zona delimitada como es la parroquia García Moreno, en la provincia de Orellana. Lo que puede significar una infección zonal. Por otro lado, la prevalencia obtenida para el gen RoTat 1.2 VSG por LAMP y por PCR, ambas con una prevalencia de 26.32% indica la presencia de *T. evansi* en la provincia. Hasta la fecha, este es el primer trabajo sobre la aplicación de técnicas moleculares para la detección del subgénero *Trypanozoon* en la provincia de Orellana. Las limitaciones presentes en este estudio radican principalmente en el número de muestras analizadas. Es necesario trabajar con una población más grande para que la prevalencia obtenida sea más significativa a nivel de provincia.

## Conclusiones

En este estudio, se muestra la aplicación de las técnicas moleculares PCR y LAMP para la detección de *Trypanosoma spp.* en la parroquia García Moreno en la provincia de Orellana. Se estandarizó la técnica molecular LAMP para la detección de *T. evansi* tipo A. A pesar de que, el revelado colorimétrico no obtuvo una sensibilidad acorde a la sensibilidad analítica, tiene una sensibilidad óptima para detectar el ADN de *T. evansi* en muestras de campo haciendo factible su uso en animales con una parasitemia alta. Por otro lado, la alta sensibilidad de nuestro ensayo de LAMP puede reflejarse al sembrar los productos en gel de electroforesis, lo que la hace una técnica apropiada para la detección del parásito en muestras de campo para incluso animales con una parasitemia baja. Nuestro ensayo LAMP es sensible, específico y conveniente para el uso en el campo y donde la incidencia de infecciones se ha vuelto baja. LAMP se puede aplicar a una amplia gama de otras enfermedades infecciosas y, por lo tanto, este estudio allana el camino para la posible utilización de LAMP como técnica de detección en estaciones de atención, en zonas de escasos recursos. Al utilizar la técnica LAMP en conjunto con los ensayos PCR, se determinó una alta prevalencia en la detección del subgénero *Trypanozoon* (68.42%) y de la especie *T. evansi* (26.32%) en distintas muestras de animales de interés pecuario en la

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

parroquia García Moreno, lo cual, es un factor de riesgo potencial que está asociado a la presencia del agente infeccioso en la zona. En el oriente ecuatoriano existen condiciones ideales para la transmisión del subgénero *Trypanozoon*, además países cercanos al oriente ecuatoriano tienen reportes de la presencia de tripanosomosis, lo que pone en riesgo a los animales domésticos y salvajes de la zona. Por esta razón, se debe destacar la importancia de implementar técnicas sensibles y específicas que proporcione resultados oportunos de la prevalencia de *Trypanosoma spp.*, pues al tener una correcta y temprana detección se pueden tomar medidas adecuadas en cuanto al tratamiento y contención de la enfermedad. El ensayo LAMP podría utilizarse como una herramienta para las estrategias de control y eliminación de la tripanosomosis.

### **Recomendaciones**

Se recomienda tener un máximo cuidado con la contaminación cruzada debido a la alta cantidad de amplicones producidos por la reacción LAMP, para esto se puede usar pipeteo estéril o la partición de las estaciones donde se realiza la reacción y donde se obtiene los productos de LAMP.

Se recomienda el uso de LAMP como un método de detección rápida en zonas de bajos recursos. Tras la detección por LAMP se puede realizar otras técnicas que apoyen al diagnóstico de la enfermedad.

Se recomienda llevar a cabo más estudios que evalúen la prevalencia de la tripanosomosis en el oriente ecuatoriano, y que estos tengan un mayor número de muestras a evaluar, para poder tener resultados más significativos a nivel provincia.

### **Bibliografía**

Abbasi, I., Kirstein, O. D., Hailu, A., & Warburg, A. (2016). Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of Leishmania DNA in

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

human blood samples. *Acta Tropica*, 162, 20–26.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.009>

- Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Büscher, P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>
- Besuschio, S. A., Llano Murcia, M., Benatar, A. F., Monnerat, S., Cruz, I., Picado, A., Curto, M. D. L. N., Kubota, Y., Wehrendt, D. P., Pavia, P., Mori, Y., Puerta, C., Ndung'u, J. M., & Schijman, A. G. (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
- Bethencourt, A. M., García, H. A., Pérez, A. M., García, M. E. G., Quijada, J. J., Cabrera, P., Vivas, I. H., Eleizalde, M. C., & Reyna-Bello, A. (2013). Prevalencia de trypanosoma spp. mediante ELISA e inmunofluorescencia indirecta en tres rebaños de búfalos de agua del estado Cojedes, Venezuela. *Fac. Cienc. Vet.*, 54(2), 89–99.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-65762013000200004](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762013000200004)
- Burgos, A. (2021). DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS. *Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas*.
- Cadioli, F. A., Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., dos Santos, G. N., André, M. R., de Almeida Castilho, K. J. G., & Machado, R. Z. (2015). Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Veterinary Parasitology*, 214(1–2), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.001>

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

- Cárdenas, R. E., Buestán, J., & Dangles, O. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*, 45(4), 511–528. <https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697633>
- Castilho Neto, K. J. G. D. A., Garcia, A. B. D. C. F., Fidelis Junior, O. L., Nagata, W. B., André, M. R., Teixeira, M. M. G., Machado, R. Z., & Cadioli, F. A. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(1). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021019>
- 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), 1635. <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. (2020). First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>
- Coello-Peralta, R. D., Solórzano, N. C. C., Peñafiel, K. A. R., Mazamba, M. D. L. S., & Echeverría, E. O. R. (2020). First report of sheep naturally infected with *Trypanosoma sp.* in Ecuador. *Ciência Rural*, 51(1). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200223>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin American*. OIE World Organization for Animal Health.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

- Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., & Jittaplaong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*, 2013, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>
- Ferrer, E. (2015). TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *Saber, Universidad de Oriente*, 27(3), 359–371. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622015000300002](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000300002)
- Franke, C., 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](https://doi.org/10.1016/0001-706x(94)90055-8)
- 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. *BioTechniques*, 46(3), 167–172. <https://doi.org/10.2144/000113072>
- Hardinge, P., & Murray, J. A. H. (2019). Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z>
- Hayashida, K., Kajino, K., Hachaambwa, L., Namangala, B., & Sugimoto, C. (2015). Direct Blood Dry LAMP: A Rapid, Stable, and Easy Diagnostic Tool for Human African Trypanosomiasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003578. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003578>
- Hinojosa Castillo, D. A. (2021). DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

SUCUMBÍOS). *Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas.*

Hoare, C. A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications.

Holland, W., Claes, F., My, L., Thanh, N., Tam, P., Verloo, D., Büscher, P., Goddeeris, B., &

Vercruyse, 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](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>

Jansson, L., & Hedman, J. (2019). Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase.

*Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100082.

<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100082>

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), 1189–1191. <https://doi.org/10.2307/3285262>

Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., Sugimoto, C., &

Igarashi, I. (2003). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5517–5524.

<https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5517-5524.2003>

Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron-

Román, J. W., Moyano, J. C., Jarrín- Porrás, E. C., Sandoval-Morejón, E. D., &

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

- Chávez-Larrea, M. A. (2017). DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma spp.* Y *Babesia spp.* MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y PCR EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR. *Revista Científica*, XXVII(3), 162–171.  
<https://www.redalyc.org/journal/959/95952010005/html/>
- Mekata, H., Konnai, S., Witola, W. H., Inoue, N., Onuma, M., & Ohashi, K. (2009). Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1301–1305. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.009>
- More, S., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Gortázar Schmidt, C., Michel, V., Miranda, M. A., Nielsen, S. S., Raj, M., Sihvonen, L., Spoolder, H., Stegeman, J. A., Thulke, H., Velarde, A., Willeberg, P., . . . Bicout, D. (2017). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): *Trypanosoma evansi* infections (including Surra). *EFSA Journal*, 15(7).  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4892>
- Njiru, Z. K., Ouma, J. O., Enyaru, J. C., & Dargantes, A. P. (2010). Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. *Experimental Parasitology*, 125(3), 196–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.01.017>
- 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), 63e-663. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

Quispe, S., Torrico, B., & Guevara, P. (2014). Diagnóstico Molecular de la Enfermedad de Chagas mediante Amplificación Isotérmica mediada por asas (LAMP). *REVISTA CON-CIENCIA N°1*, 2, 15–22.  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652014000100004](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100004)

Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2016). 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>

Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M., 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>

Salim, B., Hayashida, K., Mossaad, E., Nakao, R., Yamagishi, J., & Sugimoto, C. (2018). Development and validation of direct dry loop mediated isothermal amplification for diagnosis of *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology*, 260, 53–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.009>

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 & Vectors*, 8(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1129-2>

Schmidt, R. S., Macêdo, J. P., Steinmann, M. E., Salgado, A. G., Bütikofer, P., Sigel, E., Rentsch, D., & Mäser, P. (2017). Transporters of *Trypanosoma brucei*—phylogeny,

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

physiology, pharmacology. *The FEBS Journal*, 285(6), 1012–1023.

<https://doi.org/10.1111/febs.14302>

Steinmann, P., Stone, C. M., Sutherland, C. S., Tanner, M., & Tediosi, F. (2015).

Contemporary and emerging strategies for eliminating human African trypanosomiasis due to *Trypanosoma brucei gambiense*: review. *Tropical Medicine & International Health*, 20(6), 707–718. <https://doi.org/10.1111/tmi.12483>

Thermo Fisher Scientific. (2020, diciembre). *Bsm DNA Polymerase, Large Fragment* (N.o MAN0012034). ©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

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>

Vienna Biocenter 2020. (2021, 3 febrero). *A note on HNB dye. RTLAMP*. Recuperado 3 de febrero de 2022, de <https://www.rtlamp.org/2021/02/02/hnb-dye/>

Wells, E., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 448–449.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4)

Zaczek-Moczydłowska, M. A., Mohamed-Smith, L., Toldrà, A., Hooper, C., Campàs, M., Furones, M. D., 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), 6605.

<https://doi.org/10.3390/ijms21186605>

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA  
POR BUCLE (LAMP) PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma spp.* EN ANIMALES DE  
INTERÉS PECUARIO EN LA PROVINCIA DE ORELLANA

Zapata, R., Mesa, J., Mejía, J., Reyes, J., & Ríos, L. A. (2009). Frecuencia de infección por  
*Trypanosoma sp.* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro hatos bufaleros de  
Barrancabermeja, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 22(1), 25–32.  
<https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023521005.pdf>