



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA**

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE
ADN MEDIADA POR ASAS (LAMP) PARA SU APLICACIÓN EN LA
DETECCIÓN DE *Trypanosoma vivax* EN OVINOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la **Br. Migdelys Andreina Alejos Fernández**, como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutores: Lic. Bernardo González
Dra. Palmira Guevara

CARACAS, VENEZUELA
AGOSTO-2011

DEDICATORIA

*A mis Padres por darme la vida y regalarme diariamente su amor
sin pedir nada a cambio. Son mis seres más amados*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le agradezco a Dios por darme la oportunidad de gozar de vida y salud y poder culminar este primer paso en mi vida.

Familiares:

A mi Madre Migdalia Fernández y mi Padre Franklin Alejos por darme su gran amor, motivación y apoyo incondicional, guiándome siempre en los buenos caminos de la vida.

A mis hermanos María Gabriela y Franklin Gabriel por su amor, paciencia y valiosos consejos.

A mi Futuro esposo y padre de mi Hija Cerraf Tovar por su gran amor, apoyo, confianza, motivación y paciencia.

Académicos:

Al Prof. Bernardo González por permitirme ingresar al Laboratorios de Biología Molecular del IDECYT para iniciar este trabajo de investigación, ofreciéndome su amistad, confianza, paciencia y gran apoyo académico.

A la Dra. Palmira Guevara y Lic. Andrea la Cruz por su valiosa participación, paciencia, consejos útiles y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Armando Reyna, Dra. Marta Mendoza, Lic. David Rosales, Lic. Mariana Eleizalde, Lic. Lucinda Tavares, Roxana Gajardo y Roschman González por su amistad, grandes consejos, colaboración, motivación y sorprendentes conocimientos.

Amigos:

En especial a mis amigas Maryorie Correia y Alicia Sanabria por su valiosa amistad, apoyo incondicional y mis grandes compañeras de estudio. A mi amiga Ana victoria Ibarra por su gran amistad, colaboración, apoyo y paciencia. A mis amigos Eleinis, Raibel, Jenifer, Jenny, Yaremis, Roberto, Robert, Alejandro, Kim y Erick por su amistad, gran apoyo y compañeros de fiestas y viajes.

RESUMEN

Trypanosoma vivax es el principal agente causal de la tripanosomosis en rumiantes. Esta enfermedad se distribuye por países tropicales y subtropicales de Asia, África y América del Sur, afectando la productividad y salud de diversas especies ganaderas tales como bovinos, ovinos, búfalos y caprinos. En Venezuela, ha demostrado ser de carácter endémico, causando diversas patologías importantes que afectan directamente la sobrevivencia de los animales infectados. En vista de la importancia de *T. vivax*, es necesaria la aplicación de nuevos métodos de diagnóstico que sean rápidos, sensibles, sencillos, económicos y potencialmente aplicables en campo. La reacción de amplificación isotérmica de ADN mediada por asas (LAMP) es un nuevo método específico, sensible y de bajo costo comparado otros métodos de diagnóstico. En este estudio se desarrolló la técnica LAMP para su aplicación en la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente, empleando la secuencia de la región catalítica de la cisteína proteasa. Para ello, se inoculó un ovino mestizo sano con el aislado Apure de *T. vivax* y se llevaron a cabo seguimientos continuos de parámetros clínicos y parasitológicos. Se incluyeron en el estudio, técnicas como microhematocrito, Woo, y gota fresca. Para el análisis molecular se utilizó el ensayo *Tv*-LAMP empleando cebadores específicos y se comparó con la técnica de PCR. Los resultados mostraron que la técnica LAMP fue específica para la detección de *T. vivax* con una sensibilidad de 1trip/mL de sangre a diferencia de la sensibilidad obtenida por PCR la cual fue de 10trip/mL. Así mismo, mostró ser robusta al detectar el ADN del parásito a partir de la capa blanca obtenida de sangre infectada y en sangre tratada con buffer de lisis, disminuyendo el tiempo del procesamiento de la muestra. Los resultados positivos fueron evidenciados por electroforesis en geles de agarosa, SYBR Green y turbidez derivada de la formación de pirofosfato de magnesio.

LAMP demostró ser una técnica de fácil riesgo de contaminación por amplicones por lo que el empleo del aceite mineral como barrera entre el medio externo e interno del tubo de reacción mostró ser un método efectivo en la prevención de contaminación de los productos.

La técnica *Tv*-LAMP mostró ser capaz de detectar *T. vivax* en ovinos infectados con alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, se requieren estudios a futuros para validar el ensayo *Tv*-LAMP en condiciones de campo.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Tripanosomosis animal.....	1
1.1.2. Patología de la tripanosomosis por <i>Trypanosoma vivax</i>	3
1.1.3. Clasificación y características generales de <i>T. vivax</i>	5
1.1.4. Ciclo biológico de <i>T. vivax</i>	7
1.1.5. Métodos de diagnóstico de tripanosomosis causada por <i>T. vivax</i>	8
1.2. Amplificación isotérmica de ADN mediado por asas (LAMP).....	11
1.2.1. Mecanismo de acción de la técnica LAMP.....	12
1.2.1.1 Fases de la reacción LAMP.....	13
1.2.2. Métodos de detección del producto amplificado por la reacción LAMP.....	16
2. ANTECEDENTES	20
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Infección experimental en ovinos en estudio.....	28
4.2. Técnicas parasitológicas.....	29
4.2.1. Microcentrifugación de hematocrito (MHC) y Woo.....	29
4.2.2. Gota fresca.....	29
4.2.3. Cuantificación de parásitos en sangre por el método de Brener (1962).....	30
4.3. Obtención de ADN genómico.....	30
4.4. Técnicas moleculares.....	31
4.4.1. Reacción LAMP.....	31
4.4.1.1. Diseño de cebadores de la reacción LAMP.....	31

4.4.1.2.	Prueba de funcionalidad de los cebadores de la reacción <i>Tv</i> -LAMP para la detección de <i>T. vivax</i> en ovinos infectados experimentalmente..	34
4.4.1.3.	Estandarización de la reacción LAMP.....	35
4.4.1.4.	Análisis del producto.....	36
4.4.1.5.	Determinación de la sensibilidad y especificidad de la reacción LAMP.....	37
4.4.1.6.	Robustez de la reacción LAMP.....	38
4.4.2.	Comparación de la técnica LAMP con la PCR.....	38
5.	RESULTADOS.....	40
5.1.	Evaluación de los parámetros clínicos y parasitológicos del ovino infectado con <i>T. vivax</i>	40
5.2.	Técnica <i>Tv</i> -LAMP.....	42
5.2.1.	Diseño de cebadores de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	42
5.2.2.	Prueba de funcionalidad de los cebadores de la reacción LAMP para la detección de <i>T. vivax</i> en ovinos infectados experimentalmente.....	44
5.3.	Desarrollo de un ensayo LAMP para la detección de <i>T. vivax</i> en ovinos infectados experimentalmente.....	45
5.3.1.	Determinación de las condiciones óptimas de temperatura y Mg ⁺² de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	46
5.3.2.	Determinación de las condiciones óptimas de dNTPs de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	47
5.3.3.	Determinación de las condiciones óptimas de Betaina de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	48
5.3.4.	Determinación de las condiciones óptimas de ADN genómico de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	49

5.3.5. Detección del producto de amplificación del ensayo <i>Tv</i> -LAMP.....	50
5.3.6. Condiciones óptimas de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	52
5.3.7. Comparación de sensibilidad de las técnicas <i>Tv</i> -LAMP y PCR.....	52
5.3.8. Especificidad de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	53
5.3.9. Robustez de la técnica <i>Tv</i> -LAMP.....	54
5.3.10. Problemas de contaminación por amplicones en la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	55
6. DISCUSIÓN.....	57
7. CONCLUSIONES.....	68
8. RECOMENDACIONES.....	70
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71
10. ANEXOS.....	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>T. vivax</i>	2
Figura 2. Características generales de <i>T. vivax</i>	7
Figura 3. Ciclo Biológico de <i>T. vivax</i>	8
Figura 4. Sitio de unión de los cebadores LAMP sobre la secuencia de ADN blanco....	13
Figura 5. Fase inicial LAMP. Síntesis de la hebra molde por la Bst polimerasa al unirse el primer interno FIP. Formación de la estructura 1.....	13
Figura 6. Fase inicial LAMP. Formación de una molécula de ADN doble cadena (Estructura 3) y una molécula de ADN cadena sencilla (Estructura 4).....	14
Figura 7. Fase inicial LAMP. Formación de un asa en el extremo 5` del ADN blanco y posterior unión del primer BIP en el extremo 3`. Formación de una molécula de ADN doble cadena (estructura 6) y de una estructura con un asa en cada extremo del ADN blanco (estructura 7).....	15
Figura 8. Fase del ciclado de la reacción LAMP.....	16
Figura 9. Turbidimetría derivada de la formación de pirofosfato de magnesio en la reacción LAMP. A) Relación lineal entre la cantidad de ADN sintetizado y la cantidad de pirofosfato de magnesio producido (Mori y col., 2001). B) Diferencia en la turbidez de una reacción LAMP negativa contra una positiva de <i>Salmonella sp.</i> ,.....	18
Figura 10. Secuencia nucleotídica de la región catalítica cisteína proteasa de <i>Trypanosoma vivax</i>	32
Figura 11. Espaciación en relación a la distancia y ubicación de los cebadores en la región del ADN blanco.....	33

Figura 12. Localización de los cebadores del ensayo <i>Tv</i> -LAMP en la secuencia nucleotídica de la región catalítica cisteína proteasa de <i>T. vivax</i>	44
Figura 13. Evaluación de la funcionalidad de los oligos de la reacción <i>Tv</i> -LAMP (BIP/FIP y F3/B3) mediante un ensayo de PCR.....	45
Figura 14. Determinación de las condiciones óptimas de temperatura y concentraciones de Mg ⁺² en la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	47
Figura 15. Optimización de la concentración de dNTPs en la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	48
Figura 16. Optimización de la concentración de Betaína en la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	49
Figura 17. Optimización de la concentración de ADN genómico proveniente de un ovino infectado con <i>T. vivax</i> en la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	50
Figura 18. Detección del producto amplificado por <i>Tv</i> -LAMP empleando electroforesis en gel de agarosa.....	51
Figura 19. Detección del producto amplificado por <i>Tv</i> -LAMP empleando SYBR Green.....	51
Figura 20. Detección del producto amplificado por <i>Tv</i> -LAMP mediante la formación de precipitado de magnesio.....	51
Figura 21. Comparación de la sensibilidad de detección de <i>Tv</i> -LAMP y PCR.....	53
Figura 22. Especificidad de los cebadores de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	54
Figura 23. Robustez de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	56
Figura 24. Evaluación del problema de contaminación.....	56
Figura 25. Efecto del aceite mineral en la mezcla de reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la técnica LAMP.....	35
Tabla 2. Evaluación de la robustez. Diferentes condiciones a tratar.....	38
Tabla 3. Seguimiento de la infección experimental del ovino mediante técnicas parasitológicas.....	42
Tabla 4. Cebadores seleccionados para la reacción <i>Tv</i> -LAMP para la detección de <i>T. vivax</i>	43
Tabla 5. Condiciones óptimas de la reacción <i>Tv</i> -LAMP.....	52
Tabla 6. Promedio de temperatura normal con su punto crítico en ovinos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina	Kb: Kilobases
AC: Aglutinación Capilar	<i>L. donovani:</i> <i>Leishmania donovani</i>
ADN: Ácido dexosirribonucleico	LAMP: Amplificación isotérmica de ADN mediada por asas
ADNk: ADN de cinetoplasto	LCR: Líquido cefalorraquídeo nativo
ARN: Ácido ribonucleico	LFD: Dispositivo de Flujo Lateral
B3: Cebador externo antisentido	MgCl₂: Cloruro de Magnesio
BIP: Cebador interno antisentido	MHC: Centrifugación de microhematocrito
Blast: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	MnCl₂: Cloruro de Manganeso
<i>Bst:</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>	MPM: Marcador de peso molecular
C: Citocina	NCBI: National center for biotechnology information
dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfatos	nt: nucleótidos
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	OI: Ovino infectado
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima	p/mL: Parásitos por mililitro de sangre
F3: Cebador externo sentido	pb: pares de bases
Fg: Femtogramo	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
FIP: Cebador interno sentido	Pg: Picogramo
G: Guanina	RAPD: Amplificación al azar de Polimorfismos genéticos
HAT: Tripanosomiasis Humana Africana	ReCp: Región Catalítica de la Cisteína Proteasa
Hb: hemoglobina	
HP: Hemaglutinación Pasiva	
Ht: Hematocrito	
IFI: Inmunofluorescencia indirecta	

RFLP: Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción

RIME: Elementos Móviles Insertados al Azar

SGP: Glicoproteína de Superficie Específica

SRA: Gen asociado a la Resistencia al Suero

T. b. brucei: *Trypanosoma brucei brucei*

T. b. congolense: *Trypanosoma brucei congolense*

T. b. gambiense: *Trypanosoma brucei gambiense*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T. evansi: *Trypanosoma evansi*

T. vivax: *Trypanosoma vivax*

T: Timina

TAE: Tris- Acetato -EDTA

Taq: *Thermus acuaticus*

TBS: Prueba de frotis de sangre

Temp.: Temperatura

Tm: Temperatura de *melting* o de fusión

Trip/mL: Tripanosoma/mililitro

Tv-LAMP: LAMP para la detección de

T. vivax

1. INTRODUCCION

1.1 Tripanosomosis animal.

Uno de los principales problemas epidemiológicos y de producción animal que existe en muchos países tropicales y subtropicales de Asia, África, Centro y Sur América (Figura 1), es la tripanosomosis. La tripanosomosis es una enfermedad debilitante y comúnmente fatal en los animales domésticos, especialmente en bovinos, ovinos, equinos y pequeños rumiantes de diferentes edades, sexos y razas, producida por varias especies del género *Trypanosoma*, la cual recibe distintas denominaciones dependiendo de las características morfológicas y localización de la especie patógena (Tafur y col., 2002; Dávila y Silva, 2000). Los agentes causales de la enfermedad en América, son conocidos como *Trypanosoma vivax* que afecta principalmente a bovinos (incluyendo búfalos), ovinos y caprinos (Hoare, 1972; Dávila y Silva, 2000) y *T. evansi* que afecta a equinos y otros mamíferos (Rivera, 1996; García y col 2002). En África, además de *T. vivax* y *T. evansi*, están presentes otras especies patógenas de este género como *T. brucei brucei* causante de la tripanosomosis animal africana (Morlais y col., 1998), *T. congolense* agente patógeno de antílopes, caballos, camélidos y bovinos; y *T. theileri*, el cual infecta principalmente a rebaños de bovinos aunque no es una especie patógena (Tafur y col., 2002).

T. vivax se distribuye ampliamente en África y América del Sur. Sin embargo, se ha reportado que este hemoflagelado se ha establecido en ovinos del Este de la India (Hoare, 1972). En Latinoamérica, la tripanosomosis causada por *T. vivax* se distribuye principalmente desde Centro América hasta Suramérica, abarcando al menos países como: El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Guyana Francesa y Venezuela (Rivera 1996; Desquesnes, 2004b). En Venezuela, el *T.*

vivax fue reportado por primera vez en 1920 por Enrique Tejera, quien lo observó en bovinos y lo describió morfológica y biológicamente (Kubes, 1944; Shaw y Lainson, 1972).



Figura 1. Distribución geográfica de *T. vivax*. Los puntos rojos en países tropicales y subtropicales de África (A), al Sur de la India (B) y América del Sur (C) y indican la localización geográfica de *T. vivax* (Tomado con modificación de asiapacific.anu.edu.au).

La forma de transmisión varía dependiendo de la localización geográfica y de la especie patógena. En África, la transmisión de los tripanosomas puede ser de forma cíclica o mecánica. Para el caso del *T. congolense* y *T. brucei* es de forma cíclica debido a la alta población de la mosca tsetse (*Glossina sp.*), único vector responsable de este tipo de transmisión (Hoare, 1972). Para el *T. evansi* la transmisión es mecánica principalmente por dípteros como Tabanidae y *Stomoxys sp.* (Dia, 1997, Desquesnes y Lamine, 2004). *T. vivax* puede transmitirse tanto cíclica como mecánicamente (Hoare, 1972, Desquesnes y Lamine, 2004).

En América del Sur, donde no está presente la *Glossina sp.*, los tripanosomas son transmitidos mecánicamente por dípteros como *Tabanus sp.*, *Stomoxys calcitrans* y

Haematobia irritans (Rivera, 1996, Osório y col., 2008); mosquitos, jejenes y Simuliidae (Rivera, 1996).

Otra forma de transmisión de estos agentes patógenos es la transmisión iatrogénica, a través del uso de agujas e instrumentos contaminados durante la realización de jornadas de vacunaciones e intervenciones quirúrgicas (Desquesnes, 2004). Otro aspecto importante en la propagación del parásito en muchas regiones, es el transporte de ganado contaminado que implica un gran riesgo para el ganado susceptible, con graves efectos clínicos y patológicos sobre los mismos (Mavare y col., 1996).

Se ha sugerido que la tripanosomosis bovina y ovina tiene un carácter endémico, con aparición esporádica de brotes, teniendo una elevada prevalencia con alta morbilidad y mortalidad en regiones ganaderas de Venezuela, donde se ha requerido la aplicación de drogas curativas y preventivas como únicos recursos disponibles en la lucha contra esta enfermedad (Toro, 1990; Rivera y col., 1996; Tamasauka y col., 2006).

1.1.2 Patología de la tripanosomosis.

La tripanosomosis se caracteriza principalmente por la presencia de parásitos en sangre, fiebre y anemia. Los animales infectados usualmente presentan baja condición corporal, reducción de la productividad y a menudo alta mortalidad (Osório y col. 2008). El progreso de la infección tripanosomal depende de la especie, del aislado así como de las características propias del hospedador (Hoare, 1972; Losos, 1986).

Durante el curso de la infección, el animal manifiesta tres etapas bien definidas, denominadas “Período prepatente”, “Fase aguda” y “Fase crónica”. El período prepatente

es definido como la etapa de la infección parasitaria, comprendida desde el momento de la aparición de la sintomatología hasta la presencia del parásito en la sangre del hospedador (Osório y col., 2008). La “Fase aguda”, la cual tiene una duración de varias semanas, se caracteriza por presentar altos picos de parasitemia, fiebre y una disminución violenta de los niveles de hematocrito (Ht) y hemoglobina (Hb).

En el caso de ovinos infectados se ha observado una conducta de negación al movimiento debido a la mala condición corporal, lo que posibilita la acción hematófaga de ciertos vectores y la trasmisión de tripanosomas a animales susceptibles (García y col. 2009). Del mismo modo, estudios con ovejas infectadas experimentalmente demuestran manifestaciones de leucopenia inicial asociada con neutropenia, linfopenia y eosinopenia (Anosa, 1988). Se ha reportado que con el primer aumento de temperatura, hay incremento de la parasitemia, hemodilución y disminución de la eritropoyesis. Además se producen alteraciones a nivel metabólico, como hipoglicemia y desequilibrio en los mecanismos hepáticos y endocrinos (Losos, 1986; Sandoval y col., 1995)

Se han observado además, rasgos clínicos importantes en animales infectados con *T. vivax* como síndrome de septicemia fulminante con extensas hemorragias en la membrana de las mucosas, sangre en las heces, dificultad respiratoria, mucosas pálidas, secreción ocular serosa, secreción nasal y ocular sero-mucosa, disminución de los niveles de trombocitos, estado físico desmejorado, edemas en testículo con inflamación, incoordinación, disnea, espasmos, postración e incluso muerte (Losos, 1986; Suárez y col. 2003).

Si el animal sobrevive a la fase aguda, entra en una segunda fase denominada “Crónica”, la cual puede durar varios meses e incluso años. Ésta fase se caracteriza por mantener niveles bajos de los valores de Ht y Hb, con fluctuaciones menores, tendencia a la recuperación o elevación del número de plaquetas, caquexia progresiva, fiebre y trastornos de locomoción (Suarez y col., 2003; Losos, 1986). En este estado crónico los animales presentan baja concentración de parásitos en sangre difíciles de detectar por métodos parasitológicos convencionales (Rivera, 1996).

Diferentes investigaciones con aislados de *T. vivax* inoculados experimentalmente en ovinos y caprinos procedentes de Venezuela, han demostrado un efecto altamente patogénico de esta especie, que incluyen serios trastornos a nivel tisular, hematológico, metabólico y reproductivo (Sandoval y col., 1995; Mavare y col., 1996; González y col., 1999; Suárez y col., 2003). A nivel reproductivo se ha encontrado una disminución de la concentración, viabilidad, motilidad, así como un incremento en las atipias de los espermatozoides en toros infectados experimentalmente con *T. vivax* (Stefano y col. 1999). Además, los animales infectados manifestaron disminución en la calidad seminal, anorexia y pérdida de equilibrio.

1.1.3 Clasificación y características generales de *T. vivax*

Hoare (1972), divide el género *Trypanosoma* en dos secciones que han sido de suma utilidad. Se trata de la sección Stercoraria: flagelados metacíclicos con un gran cinetoplasto desarrollados en el tubo digestivo del vector y transmitidos por las heces; y la sección Salivaria: transmisión de flagelados metacíclicos a través de las glándulas salivares del vector. *T. vivax* se ubica en la sección Salivaria (Hoare, 1972). El incremento de la

complejidad de los tripanosomas ha requerido una clasificación más acorde en base a las hipótesis filogenéticas.

Según Brener, (1979), Levin y col., (1980) y Rivera (1996), *T. vivax* se ubica taxonómicamente en: **Dominio:** Eukaria; **Reino:** Protozoa; **Phylum:** Euglenozoa; **Clase:** Kinetoplastidea; **Orden:** Trypanosomatina; **Familia:** Trypanosomatidae; **Genero:** *Trypanosoma*; **Subgénero:** *Duttonella* y **Especie:** *Trypanosoma vivax*.

Hoare, (1972), mediante análisis biométricos a partir de muestras de sangre infectadas con *T. vivax*, reportó que la longitud del cuerpo de este hemoflagelado oscila en un rango de 18 a 31 μm , incluyendo la longitud del flagelo libre que oscila en un rango de 3 a 6 μm . Sin embargo, estas longitudes varían entre los aislados de una localidad y otra, encontrándose, por ejemplo en Guyana francesa y Venezuela, parásitos cuya longitud oscila entre 20 a 26 μm hasta otros más pequeños, con medidas entre 15 μm a 16 (Desquesnes, 2004). Actualmente, se determinó por Gómez (2011) que la dimension promedio de los aislados venezolanos de *T. vivax* es 21 μm .

Los hemoparásitos de la familia *Trypanosomatidae* presentan en su citosol un organelo puntiforme remarcado denominado Cinetoplasto (ADNk). El cinetoplasto de la mayoría de los miembros de esta familia, está organizado en una compleja red con dos tipos de moléculas circulares de ADN topológicamente interconectados, denominadas minicírculos y maxicírculos (Borst y col., 1985). Cada red contiene varias decenas de maxicírculos, en la mayoría de las especies el rango de tamaño es de 20 a 40kilobases (Kb) y cientos de minicírculos cuyo tamaño oscila entre 0,5 \pm 2,5kb (Morris y col., 2001). Sin embargo, *T. evansi* y *T. equiperdum* (otro tripanosoma del grupo *brucei* y también parásito

de los equinos), son los únicos tripanosomas que en forma natural carecen de maxicírculos en el ADNk (Canelón y Meléndez., 2003). El *T. vivax* presenta un gran cinetoplasto redondeado, cuya forma puede variar de circular a elíptica, y usualmente se encuentra posicionado terminalmente (Figura 2). Sin embargo, en algunas formas de este parásito el cinetoplasto puede estar en una posición subterminal o marginal. (Hoare, 1972).

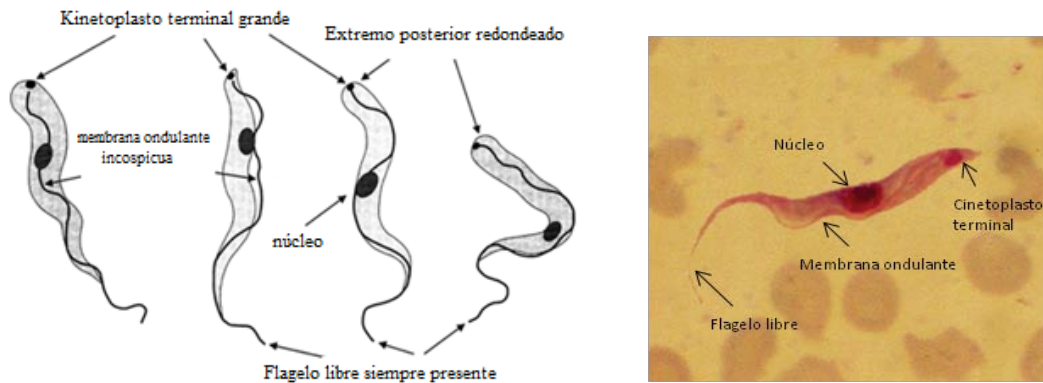


Figura 2. Características generales de *T. vivax*. A) Dibujo esquemático de *T. vivax* (modificado de www.lookfordiagnosis.com). B) Frotis de sangre de un bovino infectado con *T. vivax* de la región de Pantanal en Brazil. Tinción panóptica, 1000x inmersión (Tomado con modificación de Osório y col. 2008).

1.1.4 Ciclo biológico de *T. vivax*.

T. vivax es un parásito que requiere de la participación de dos tipos de hospedadores, hospedador invertebrado: dípteros hematófagos; hospedador vertebrado: mamíferos. En África, el parásito presenta un ciclo de vida alterno que incluye tanto el hospedador invertebrado, *Glossina* sp., como el hospedador mamífero. Dentro de la mosca tsetse el *T. vivax* es capaz de multiplicarse y permanecer en la fase infectiva durante toda la vida del insecto (Osório y col. 2008). El parásito se desarrolla en la proboscis de este organismo donde la forma tripomastigote pasa a forma epimastigote. Esta fase es crucial y conduce al desarrollo de tripomastigotes metacíclicos, los únicos capaces de infectar hospedadores

vertebrados a través de las picaduras de las moscas tsetse infectadas (Figura 3A) (Hoare, 1972; Osório y col. 2008).

Por el contrario en América del Sur, donde no existe la mosca tsetse, el parásito se transmite de forma mecánica (directa) sin multiplicación ni crecimiento en el hospedador invertebrado. Una vez en el hospedador mamífero, el *T. vivax* es capaz de dividirse por fisión binaria, la cual es iniciada por bipartición del cinetoplasto, ocasionando las patologías mencionadas anteriormente (Figura 3B) (Hoare, 1972; Rivera, 1996; Osório y col. 2008).

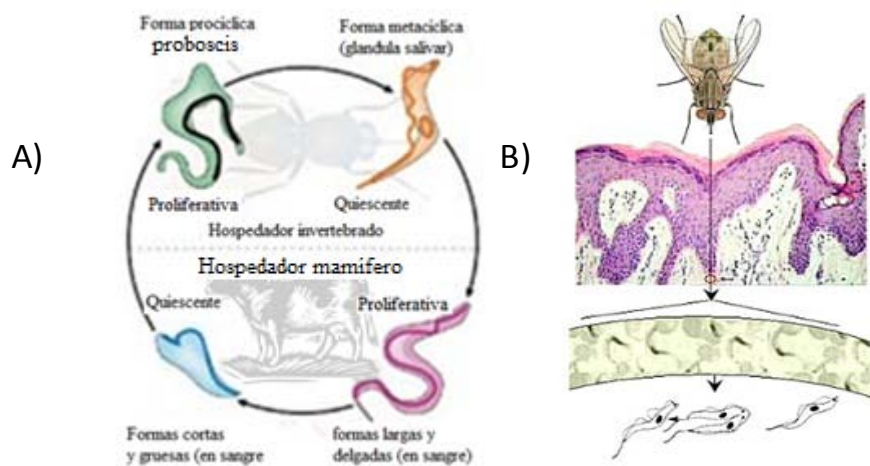


Figura 3. Ciclo Biológico de *T. vivax*. A) Transmisión cíclica de *T. vivax* en *Glossina sp.* (Modificado de Pays y col., 2006). B) Transmisión mecánica de *T. vivax*. (Modificado Gardiner y col., 1988).

1.1.5 Métodos de Diagnóstico de tripanosomosis causada por *T. vivax*.

Entre las técnicas que se emplean para la detección de *T. vivax* se encuentran las técnicas directas como las parasitológicas Woo, gota fresca, y PCR, e indirectas como la hemaglutinación, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) e IFI (inmunofluorescencia indirecta). En Venezuela actualmente, se emplean estas metodologías para el diagnóstico de la tripanosomosis causada por *T. vivax*. La

microscopía ha sido tradicionalmente utilizada en la identificación positiva de *T. vivax* (Woo 1971; Murray y col., 1977). El diagnóstico parasitológico de infecciones activas está basado en la detección microscópica de parásitos en muestras de sangre fresca (morfología, morfometría y motilidad de los parásitos en los tejidos) (Desquesnes y Dávila, 2002), mediante técnicas como Woo y “*buffy-coat*” (Woo, 1969; Murray y col. 1977). Estas técnicas se basan en la centrifugación en tubos capilares de muestras de sangre de ovinos en estudio y posterior observación de la capa blanca; presentan una sensibilidad de 700 tryp/mL en el caso de *T. vivax* (Woo, 1969; Desquesnes, 2004). Sin embargo, las técnicas parasitológicas son poco sensibles en la fase crónica de la enfermedad debido a la baja concentración de parásitos en sangre de animales infectados durante este estadio, por lo que el empleo de estas técnicas es limitado al momento de examinar la prevalencia de tripanosomosis en condiciones de campo (Nantulya, 1990).

Debido las limitaciones del diagnóstico parasitológico se ha requerido el desarrollo de técnicas de diagnóstico alternativas para este agente patógeno, entre ellas se encuentra el ELISA (Nantulya, 1990; Luckins, 1977). Este ensayo está basado en la sensibilización de antígenos solubles extraídos del parásito y los cuales son añadidos al suero de los organismos en estudio fijados sobre placas de poliestrieno. Las inmunoglobulinas específicas se unen a los antígenos y son visualizados por un anticuerpo enlazado a una enzima marcada con un fluoróforo, capaz de emitir color al unirse a un sustrato. El ELISA presenta la ventaja de tener excelente reproducibilidad, es de bajo costo y alta capacidad de procesamiento de muestras (Desquesnes, 2004). Pero si bien este método ha sido utilizado para el diagnóstico de este hemoflagelado, tiene sus limitaciones debido a que no es capaz de diferenciar entre una infección activa o una infección pasada (Masake y col., 1997), además de que existe la posibilidad de que ocurra reacción cruzada con otras

especies de tripanosomas como *T. brucei*, *T. congolense* (Luckins y col. 1977). Otras técnicas serológicas han sido aplicadas para el diagnóstico de *T. vivax* como IFI (Tamasaukas y col., 1998; González, y col., 1999). Esta técnica permite la detección directa de anticuerpos mediante observación al microscopio de marcaje fluorescente al agente patógeno, pero presenta sus limitaciones ya que es subjetivo y depende del criterio y entrenamiento del observador, además de que presenta baja sensibilidad en fase crónica de animales con tripanosomosis. Se han empleado además técnicas como Hemaglutinación Pasiva (HP) y Aglutinación Capilar (AC). Dichas técnicas pueden emplearse en condiciones de campo pero tienen la limitación de que los antígenos empleado son altamente inestables, no es aplicable en estudios a gran escala y existe la posibilidad de que ocurra reacción cruzada con especies de este mismo género como la reportada por Toro y col. (1981) quienes observaron que el antígeno preparado con *T. evansi* reaccionó con sueros provenientes de bovinos infectados con *T. evansi* y/o *T. vivax*.

Recientemente se ha empleado la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ideada por Kary Mullis en 1985, la cual está basada en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos específicas empleando una DNA polimerasa, deoxinucleótidos (dNTPs), buffer apropiado y cebadores especie-específicos. Esta metodología se ha aplicado para la identificación precisa de *T. vivax* y otros tripanosomas empleando marcadores moleculares especie-específico localizada en el genoma de este parásito hemotrópico (Masiga y col., 1992; Masake y col., 1997; Almeida y col., 1997; Nijiru y col., 2005). Se ha asociado la PCR además con ensayos de digestión enzimática basados en la generación de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para la identificación de polimorfismos genéticos y evaluando la variabilidad intraespecífica entre los aislados de *T. vivax* (García y col., 2009). La técnica RAPD (amplificación al azar de polimorfismos genéticos) ha sido otro

método molecular aplicado en la identificación *T. vivax* (Dávila y col., 1997). Sin embargo, el empleo de cebadores que anclan al azar limita la aplicabilidad de esta metodología ya que las condiciones de amplificación deben establecerse de manera que los patrones resultantes sean reproducibles, lo cual requiere ADN altamente purificado. Estas técnicas son altamente sensibles y específicas, pero difíciles de realizar bajo condiciones de campo donde se requiere un método de diagnóstico rápido y efectivo de animales infectados con *T. vivax* debido al requerimiento de personal capacitado y equipos de laboratorios especializados.

La aparición de brotes severos de *T. vivax* en rebaños de ovinos, bovinos y caprinos de Venezuela con serias implicaciones económicas y sanitarias por sus efectos adversos a la salud y a la producción animal, amerita realizar investigaciones enfocadas al desarrollo de técnicas de diagnóstico específicas, sensibles y de bajo costo en condiciones de campo que permitan la detección rápida de este agente patógeno y la aplicación inmediata de tratamiento apropiado para el control de la enfermedad.

1.2. Amplificación isotérmica de ADN mediada por asas (LAMP).

Recientemente, ha sido desarrollada una nueva técnica para la amplificación de material genético por Notomi y col (2000) denominada *LAMP*, Amplificación Isotérmica mediada por Asas (por sus siglas en inglés *Loop-mediated Isothermal Amplification*), que ofrece numerosas ventajas en comparación con otras técnicas moleculares como la PCR. En este sentido, LAMP permite amplificar de manera eficiente y rápida secuencias de ácidos nucleicos específicas bajo condiciones isotérmicas desde unas pocas copias hasta 10^9 copias en menos de una hora, empleando una ADN polimerasa con actividad

desplazante de cadena sencilla, *Bst-Polimerasa* (extraída de *Bacillus stearothermophilus*) y un conjunto de cuatro cebadores (dos internos y dos externos) los cuales contienen secuencias (sentido y antisentido) que reconocen específicamente a 6 regiones distintas en el ADN blanco (Figura 4) (Notomi y col., 2000). Debido a la actividad desplazante de la *Bst polimerasa*, no se requieren cambios de temperatura para la desnaturalización del ADN e hibridación con los oligos prescindiendo así del uso del termociclador en la incubación de la reacción de amplificación. Otra ventaja de la técnica LAMP sobre la PCR, es que el producto final puede ser visualizado directamente sin requerir el empleo de la electroforesis en geles de agarosa.

1.2.1.Mecanismo de acción de la técnica LAMP.

Para comprender mejor el mecanismo de acción de LAMP se muestra la Fig. 4, donde se describen las seis regiones del ADN blanco denominadas F3, F2, F1, B1c, B2c y B3. Los extremos de la región de amplificación son llamados F3c (*forward*) y B3 (*backward*) de 17-21 nucleótidos de longitud respectivamente. Al interior de estas secuencias se hallan dos secuencias de 23-24nt denominadas F2c y B2. Adicionalmente, entre la región F2c y B2 se encuentran dos regiones denominadas F1c y B1 (23-24nt). Los cebadores externos son diseñados delimitando los extremos de la región de amplificación, a su vez, el cebador interno forward (FIP) está compuesto de las secuencias F1c complementaria a la región F1 en el ADN blanco y la secuencia F2 complementaria a la región F2c, ambas secuencias separadas por un espaciador de cuatro timinas (TTTT). De la misma manera, el cebador interno backward (BIP) contiene las secuencias B1c complementaria a B1 en el ADN blanco y la secuencia B2 complementaria a B2c igualmente separadas por cuatro timinas (Figura 4).

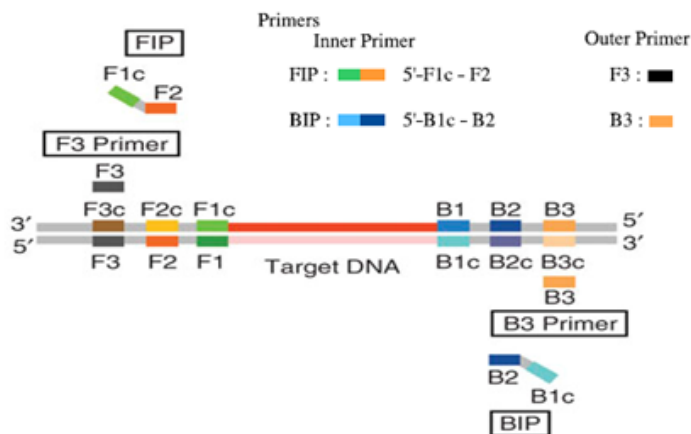


Figura 4. Sitio de unión de los cebadores LAMP sobre la secuencia de ADN blanco. Se muestran seis regiones distintas sobre la secuencia de ADN blanco que se desea amplificar, F3, F2, F1, B1c, B2c and B3. La letra c indica secuencia complementaria (Mori y col., 2004).

1.2.1.1 Fases de la reacción LAMP.

Según Notomi y col. (2000), la reacción LAMP consiste en tres fases: la primera fase se ha denominado “Fase inicial de LAMP”. Esta primera fase se inicia cuando uno de los cebadores internos hibrida con la secuencia complementaria, por ejemplo, el cebador interno FIP se alinea con la secuencia F2c del ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria mediante la adición de los dinucleótidos trifosfato (dNTPs) por la *Bst* polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra (Figura 5, estructura 1) (Notomi y col., 2000).

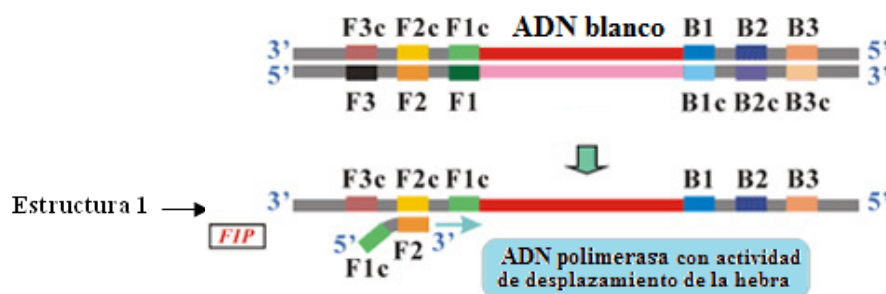


Figura 5. Fase inicial LAMP. Síntesis de la hebra molde por la *Bst* polimerasa al unirse el primer interno FIP. Formación de la estructura 1 (Mori y col., 2004).

Posteriormente el cebador externo F3, el cual es de menor tamaño y se encuentra en menor concentración en la mezcla de reacción, hibrida a la secuencia complementaria F3c fuera de la secuencia de unión a FIP (estructura 2), e inicia la síntesis de una hebra complementaria a la hebra molde (doble cadena) (Figura 6, estructura 3) liberando la hebra de ADN recién sintetizada por FIP (Figura 6, estructura 4) (Notomi y col., 2000).

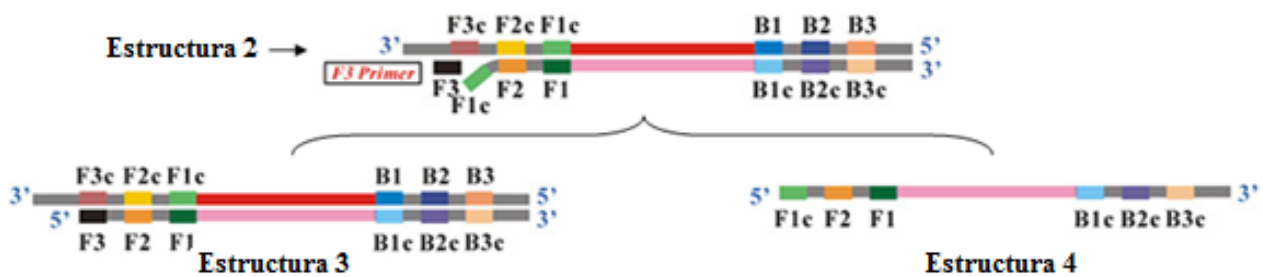


Figura 6. Fase inicial LAMP. Formación de una molécula de ADN doble cadena (Estructura 3) y una molécula de ADN cadena sencilla (Estructura 4) (Mori y col., 2004).

La hebra liberada (cadena sencilla) produce un tallo doble cadena y un asa en el extremo 5' por complementariedad de bases entre la secuencia F1 recién sintetizada y la secuencia F1c dada por el cebador FIP (Figura 6, estructura 4). Esta estructura sirve ahora como molde para la síntesis de la hebra complementaria iniciada por el cebador BIP. El cebador interno BIP que lleva la secuencia B2 hibrida en la región B2c del ADN blanco e inicia la síntesis de la cadena complementaria (Figura 7, estructura 5). A través de este proceso, el ADN revierte de una estructura en forma de asa en el extremo 5' a una estructura lineal. Simultáneamente, el cebador externo B3 hibrida a la secuencia complementaria B3c del ADN blanco fuera del sitio de unión del cebador BIP, y con ayuda de la polimerasa inicia la síntesis de la hebra desde el extremo 3' a al extremo 5', liberando el ADN cadena sencilla sintetizada por el cebador BIP. Originándose una doble cadena de ADN (Figura 7, estructura 6), y una cadena sencilla capaz de formar un tallo doble cadena

y un asa en ambos extremos del ADN blanco (Figura 7, estructura 7) (Notomi y col., 2000).

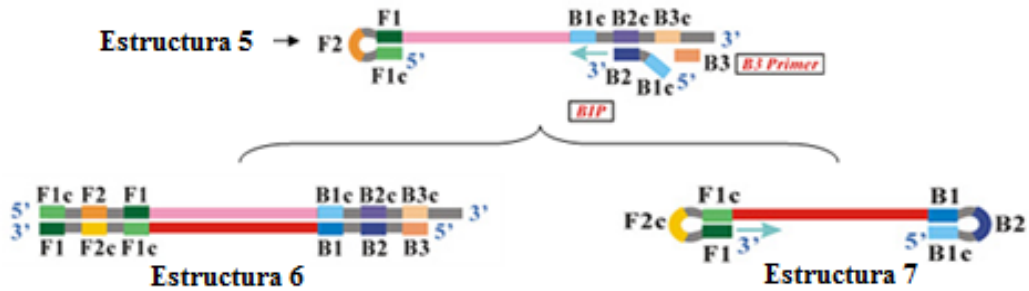


Figura 7. Fase inicial LAMP. Formación de un asa en el extremo 5' del ADN blanco y posterior unión del primer BIP en el extremo 3'. Formación de una molécula de ADN doble cadena (estructura 6) y de una estructura con un asa en cada extremo del ADN blanco (estructura 7) (Mori y col., 2004).

La estructura 7 sirve ahora como molde para las fases posteriores de la reacción LAMP. Esta estructura inicia la segunda fase denominada “Fase de ciclado”. En esta fase, el cebador interno FIP alinea a la secuencia F2c (Figura 7, estructura 7) que se encuentra en cadena sencilla dentro del asa, e inicia la síntesis de una nueva hebra de ADN en dirección 5' separando las secuencias complementarias F1c de F1. Simultáneamente, a partir del extremo 3' libre de F1, la Bst polimerasa inicia la síntesis de otra hebra de ADN complementaria en dirección 5' (Figura 7, estructura 7) (Notomi y col., 2000). Luego, comenzando del extremo 3' de la región B1, se inicia la síntesis de ADN utilizando esto como un auto-cebador para sintetizar una hebra complementaria y posteriormente liberar la hebra sintetizada por el cebador FIP en esta fase de la reacción (Figura 8; estructura 8). La hebra liberada forma nuevamente un asa en cada extremo por complementariedad de bases entre F1y F1c, así como B1 y B1c, respectivamente (Figura 8; estructura 10). Esta estructura es equivalente a la estructura 7 formada en el paso inicial de la reacción LAMP, por lo que de forma similar sigue los pasos para formar las estructuras 8 y 9, pero con la diferencia de que conduce a la síntesis de ADN a partir del extremo 3' de la región F1

donde la polimerasa puede incorporar dNTPs sin el requerimiento de los cebadores (auto-cebador) originando la estructura 12 (Figura 8) (Notomi y col., 2000).

Posteriormente, el cebador BIP alinea a la región B2c permitiendo la síntesis de ADN por la polimerasa, liberando la hebra sintetizada por el auto-cebador B1. Se producen nuevamente estructuras similares a la estructura 8 y 10 (Figura 8), así como la misma estructura 7 (Figura 8). Los cebadores internos BIP y FIP hibridan a las estructuras 10 y 12 respectivamente, continuando la síntesis de ADN aumentando así el número de copias de la secuencia blanco, lo que corresponde a la tercera fase de la reacción denominada “Fase de elongación” (Notomi y col., 2000).

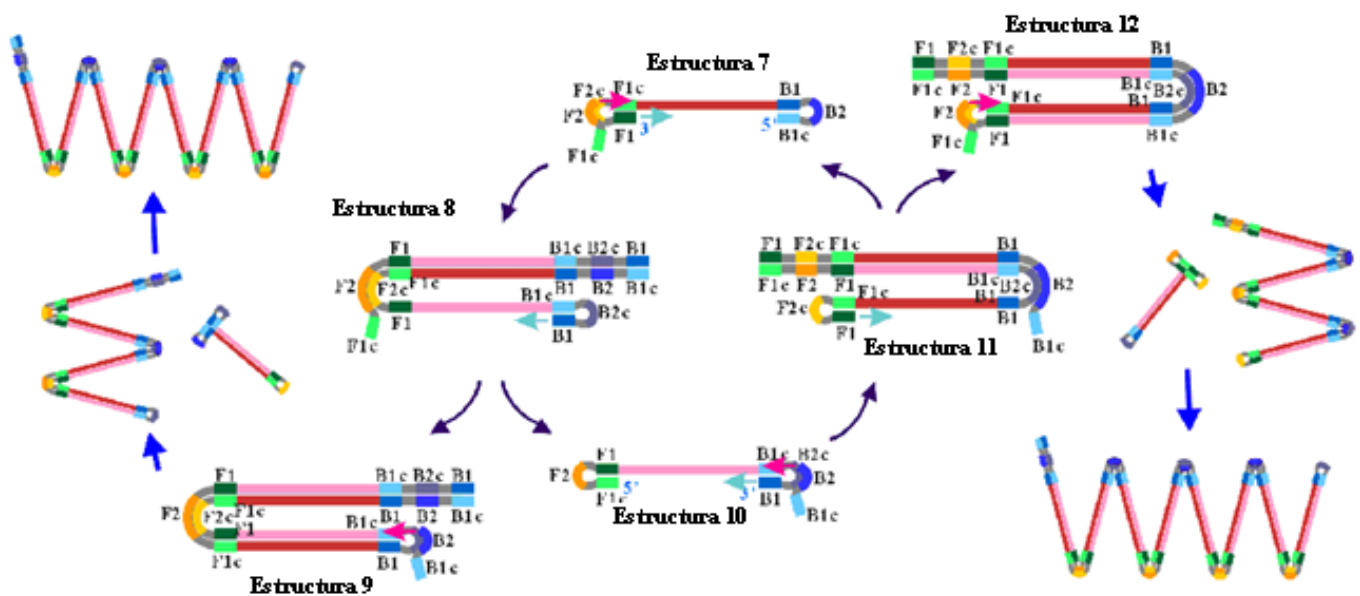


Figura 8. Fase del ciclado de la reacción LAMP. Se muestran las estructuras que se van originando durante el proceso de la técnica LAMP (Mori y col., 2004).

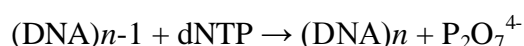
1.2.2 Métodos de detección del producto amplificado por la reacción LAMP.

Existen diversos métodos de detección del producto amplificado mediante la reacción LAMP, entre ellos se encuentran la electroforesis en gel de agarosa (Notomi y

col., 2000), la Detección visual por fluorescencia (Notomi y col., 2000), Fluorescencia en tiempo real (Notomi y col., 2000), Turbidimetría (Mori y col., 2001), Turbidimetría en tiempo real (Mori y col., 2004), Detección visual por adición de polímeros catiónicos (Mori y col., 2006), Detección por el método ABC-LAMP (Tani y col., 2007), Detección visual por dispositivo de flujo lateral (LFD) (Kiatpathomchai y col., 2008), Detección visual empleando metales indicadores (Tomita y col., 2008) y Colorimetría utilizando azul de hidroxinaphthol (Goto y col., 2009)

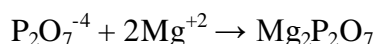
En este estudio, proponemos detectar el producto amplificado de la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* mediante la turbidez derivada por la formación del precipitado de magnesio, fluorescencia mediante la adición de SYBR Green y electroforesis en geles de agarosa. Emplearemos estos métodos por ser económicos y rápidos.

La Turbidimetría consiste en la formación de un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio producto del ion pirofosfato liberado durante la polimerización del ADN por la *Bst polimerasa*. Gran cantidad de este ión es liberado, por lo que el pirofosfato es capaz de interactuar con los iones magnesio en la mezcla de reacción formando el precipitado (pirofosfato de magnesio) (Mori y col., 2001). Esta reacción puede ser resumida mediante la siguiente ecuación:



La LAMP genera más de 4 μg de ADN lo cual es requerido para alcanzar una concentración aproximada del ión pirofosfato mayor a 0,5mM, lo que trae como

consecuencia la interacción de cargas entre los iones magnesio y pirofosfato por interacción de cargas y genera el precipitado:



Por el contrario, en un ensayo de PCR, se producen alrededor de 0,2µg/25µL de ADN y la concentración del ión pirofosfato aproximada es de 0,02mM, por lo que no se produce el precipitado (Mori y col., 2001). Otra razón es que debido a las altas temperaturas empleadas en la PCR durante la fase de desnaturalización del ADN, el ión pirofosfato es hidrolizado a ión fosfato y por lo tanto no hay interacción con los iones magnesio ni formación del precipitado (Mori y col., 2001).

Existe una correlación lineal entre la cantidad de ADN sintetizado y la cantidad de pirofosfato de magnesio producido (Figura 8). La ausencia o presencia del precipitado en la mezcla de reacción, indica la ausencia o presencia de ADN blanco respectivamente (Figura 8) (Mori y col., 2001).

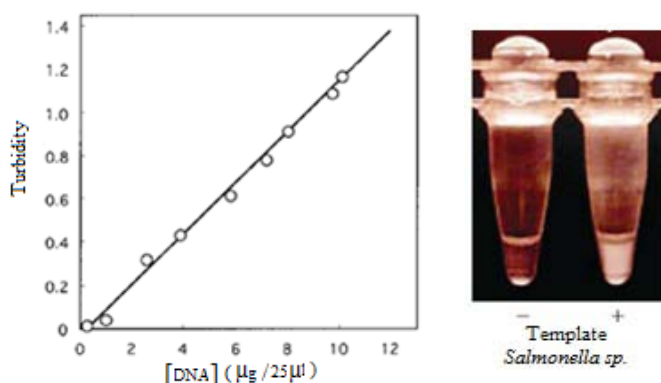


Figura 9. Turbidimetría derivada de la formación de pirofosfato de magnesio en la reacción LAMP. A) Relación lineal entre la cantidad de ADN sintetizado y la cantidad de pirofosfato de magnesio producido (Mori y col., 2001). B) Diferencia en la turbidez de una reacción LAMP negativa contra una positiva de *Salmonella* sp., (tomado de http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/detect_index.html).

Por otra parte, la fluorescencia consiste en la adición de colorantes fluorescentes a la mezcla de reacción que se intercalan al ADN doble cadena. Los tubos que contienen los productos amplificados pueden ser visualizados directamente en presencia de colorantes fluorescentes como SYBR Green, Bromuro de etidio, entre otros empleando un transiluminado de luz UV. Sin embargo, en la práctica la inspección visual es realizada a través de la observación directa de un cambio de color mediante la adición de SYBR Green al tubo de reacción, un cambio de color de naranja a verde indica la síntesis de ADN (Parida y col., 2008).

2. ANTECEDENTES

La técnica LAMP fue desarrollada inicialmente por Notomi y col., en el año 2000, quienes utilizaron como modelo de estudio la región HBs del virus de la Hepatitis B. Los autores demostraron que la técnica es altamente específica, sensible y rápida, bajo condiciones isotérmicas para la detección de secuencias específicas desde seis copias de ADN blanco. El producto amplificado está constituido por múltiples bandas observadas como un barrido (*smear*) en la corrida electroforética, debido a la formación de estructuras en forma de tallo – asa con repeticiones invertidas y alternadas de la secuencia blanco producidas durante la reacción, partiendo de un producto base (Figura 8).

Mori y col. (2001), propusieron utilizar el precipitado de pirofosfato de magnesio como indicador de positividad de la amplificación e inclusive demostraron la correlación lineal con la síntesis de ADN.

Mori y col. (2004) encontraron una correlación lineal entre la formación del precipitado de pirofosfato y la síntesis de ADN, proponiendo cuantificar la cantidad de ADN sintetizado por monitoreo en tiempo real empleando un turbidómetro.

LAMP se ha aplicado recientemente para la identificación de especies de tripanosomatideos. Estudios realizados por Kuboki y col. (2003), demostraron la aplicabilidad de ésta técnica en la identificación de *T. brucei* empleando la secuencia *PFR* específica. Incluyeron en el estudio *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense* y *T. evansi* y evaluaron la positividad de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa para todas estas especies. En este estudio se detectó el ADN de los parásitos

durante todos los días post-infección empleando el método LAMP, comparado con PCR el cual pudo detectar la presencia del ADN del parásito a partir de 10 días post-infección, concluyendo que la sensibilidad de la técnica LAMP es 100 veces más alta que los métodos basados en PCR.

Por otra parte, Thekisoie y col. (2005), emplearon LAMP para la detección de *T. evansi* en cerdos infectados experimentalmente y la compararon con técnicas parasitológicas y la PCR. Estos investigadores observaron un alto nivel de detección positiva por el método LAMP comparado con PCR y las técnicas parasitológicas como MHC y prueba de frotis de sangre (TBS), lo cual confirma resultados previos realizados por Kuboki y col. (2003). Los autores concluyen que la técnica LAMP ofrece una alternativa para el diagnóstico de *T. evansi* en países endémicos y pocos desarrollados debido a la habilidad de sintetizar gran cantidad de ADN y fácil detección del producto por inspección visual de la turbidez descrita por Mori y col. (2001).

Thekisoie y col. (2007), desarrollaron la técnica LAMP para la detección específica de tripanosomosis humana y animal. Diseñaron los cebadores para marcadores moleculares específicos de diferentes especies del género *Trypanosoma*, tales como la región ITS2-5.8S rRNA para *T. brucei gambiense*, rRNA 18S tanto para *T. congolense* como para *T. cruzi*, y una glicoproteína de superficie VSG RoTat 1.2 para *T. evansi*. Los autores determinaron que el método fue específico para cada una de las especies de tripanosomas capaz de detectar hasta 1 femtogramo (fg) del ADN del parásito.

Njiru y col. (2008a), evaluaron la técnica LAMP en la detección del sub-género *Tripanozoon* con cebadores diseñados a partir de la secuencia conservada de elementos

móviles insertados al azar (RIME) de éste género en aislados de *T. brucei rhodesiense* y *T. gambiense*. En este estudio se reportó una sensibilidad analítica del ensayo RIME-LAMP equivalente a 0.001 trip/mL; mientras que por un ensayo clásico de PCR el rango fue de 0.1 a 1000 trip/mL, indicando que podría ser posible detectar mediante LAMP bajas parasitemias en pacientes infectados con este parásito. Los autores concluyen que la sensibilidad y fácil aplicación de esta técnica, junto con la capacidad de detectar el producto visualmente sin la necesidad de equipo sofisticado, indican que LAMP tiene gran potencial para la detección de tripanosomosis africana en humanos.

Para esta misma fecha, Njiru y col. (2008b) reportaron la evaluación de la técnica LAMP para *T. brucei rhodesiense* basado en el gen asociado a la resistencia al suero (SRA), encargado de la forma aguda de la enfermedad africana del sueño. Se emplearon cebadores específicos a este gen para detectar al ADN de tripanosoma presente en la capa blanca de sangre infectada, una alícuota precalentada y otra alícuota sin precalentar. Obtuvieron un límite de detección de 1 picogramo (pg) de ADN purificado (equivalente a 10trip/mL) y 0.1 pg (1 trip/mL) usando la capa leucocitaria tratada con calor, mientras que el límite de detección para el ensayo SRA-PCR fue de 1000 trip/mL. Los autores demostraron que la sensibilidad analítica del ensayo SRA-LAMP aumentó cuando precalentaron el templado (ADN o sobrenadante) y concluyeron que el uso de un proceso de precalentamiento de la muestra sin comprometer la sensibilidad, elimina la necesidad de la extracción del ADN. Así mismo, demostraron la utilidad de este gen como blanco en la detección de ADN de *T. brucei rhodesiense* usando la técnica LAMP.

Otro estudio relacionado con la amplificación de ADN de tripanosomatideos mediante LAMP fue el realizado por (Thekiso y col., 2009). Los investigadores estudiaron la

estabilidad de los reactivos de la mezcla de reacción LAMP y su eficiencia de amplificación en templados de ADN crudo de tripanosomas. Los reactivos LAMP fueron almacenados a -20°C, 25°C y 37°C y luego probados en la amplificación de *T. brucei brucei* (GUTat 3.1) y *T. brucei gambiense* (IL2343), encontrando que no existían diferencias significativas en la sensibilidad de detección de estas especies patógenas en todas las condiciones evaluadas. Los investigadores concluyen que la técnica LAMP tiene alto potencial para ser usada en condiciones de campo para el diagnóstico de tripanosomosis, sin ser afectada la sensibilidad por la temperatura ambiental de países tropicales y subtropicales, donde esta enfermedad es endémica.

Estudios recientes llevados a cabo por Njiru y col. (2010), evaluaron el uso de la técnica LAMP para su aplicación en la detección de la cepa B de *T. evansi*. En este trabajo, utilizaron como blanco la secuencia VSG JN 2118Hu específica de la cepa B de *T. evansi* empleando la técnica LAMP y un ensayo clásico de PCR. Los autores reportan que la sensibilidad analítica del ensayo LAMP fue de 0,1trip/mL, mientras que por la prueba de PCR del mismo gen fue de 10trip/mL. Por otra parte, emplearon diferentes métodos de detección del producto amplificado por LAMP (tinción por SYBR Green, electroforesis en gel de agarosa, turbidimetría en tiempo real, análisis de restricción y cromatografía con dispositivo de flujo lateral), obteniendo un 100% de la eficiencia en todos los métodos empleados. Los autores concluyen que, la prueba es específica para la cepa B de *T. evansi* y no mostró amplificación de secuencias inespecíficas, por lo que este estudio podría distinguir entre las cepas A y B de este hemoflagelado, en ausencia de síntomas clínicos del animal infectado. Este dispositivo de flujo lateral disminuye el riesgo de contaminación y generación de resultados falsos-positivos.

Por otra parte, se desarrolló la técnica LAMP para la detección específica de *T. cruzi* y *T. rangeli* basado en los genes de la unidad 18S ARNr y en los genes de ARN nuclear pequeño respectivamente realizado por Thekiso y col. (2010). El ensayo LAMP para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* fue específica en cada caso, sin reacción cruzada con ADN humano, ADN del vector o de cada uno de estos tripanosomas. Adicionalmente, reportaron una sensibilidad analítica para el ensayo LAMP de 100fg para *T. cruzi* y 1pg para *T. rangeli*. Los investigadores indican que este estudio brinda una posible alternativa como herramienta de diagnóstico molecular para confirmar la presencia de ambos parásitos en vectores infectados, muestras clínicas, muestra de transfusión de sangre y durante el trasplante de órganos. Así mismo, concluyen que la enzima *Bst polimerasa* empleada en la reacción no es afectada por componentes de la sangre y derivados de tejidos como mioglobina, complejos proteicos sangre-grupo hemo e inmunoglobulinas G.

En este mismo año, Matovu y col. (2010), realizaron un estudio comparativo de la técnica LAMP con la técnica PCR para la detección de ADN de tripanosomas empleando sangre de pacientes con tripanosomiasis humana africana (HAT) preservadas en papel FTA. Para ello, emplearon como marcadores moleculares la secuencia conservada RIME y SRA de *T. b. rhodesiense* y una glicoproteína de superficie específica (TgSGP) de *T. brucei gambiense*. Los investigadores reportaron que la técnica RIME- y SRA-LAMP fue significativamente más sensible en base al número de muestras positivas que el ensayo SRA-PCR y al tratamiento de la muestra en el papel FTA. Todas las muestras de campo evaluadas mediante el ensayo TgSGP-PCR fueron negativas.

Wastling y col. (2010) realizaron un estudio comparativo de métodos de detección del producto LAMP aplicados al diagnóstico de HAT, empleando como marcadores

moleculares la secuencia conservada RIME y la secuencia *PfrA* para el subgénero *Trypanozoon* y la secuencia SRA para *T. brucei Rhodesiense*. Los métodos empleados fueron 1) visualización de la turbidez; 2) adición de azul de hidroxinaftol antes de la incubación de la mezcla de reacción; 3) adición de calceína con $MnCl_2$ antes de la incubación y 4) adición de Quant-iT PicoGreen después de la incubación. El azul de hidroxinaftol fue mejor que los otros métodos de detección comparados, por lo fácil, económico, preciso y confiable interpretación de los ensayos LAMP para el diagnóstico de HAT. La detección visual de la turbidez no fue posible en todas las reacciones; la adición de calceína con $MnCl_2$ afecta la sensibilidad de la reacción LAMP y por último el reactivo Quant-iT es costoso para el empleo en el diagnóstico de esta enfermedad.

Njiru y col. (2011a) realizaron el ensayo LAMP para la detección del Grupo 1 de *T. brucei gambiense* empleando la secuencia del gen TgsGP. Los autores demostraron que el ensayo fue específico y capaz de amplificar ADN del parásito en muestras clínicas. Así mismo, reportaron una sensibilidad de 10trip/mL usando ADN purificado y 1tryp/mL cuando se empleó el sobrenadante con derivados de sangre, en comparación con los ensayos de PCR que se obtuvo una sensibilidad de 10 a 10^3 trip/mL. Además se encontró que el ensayo fue capaz de detectar ADN del parásito en líquido cefalorraquídeo nativo (LCR), en sobrenadante doblemente centrifugado a partir de la capa leucocitaria y aspirado de médula ósea. Los autores concluyen que la robustez, sensibilidad y capacidad de detectar los productos visualmente proporcionan gran potencial al ensayo TgsGP LAMP como prueba diagnóstica de HAT.

En este mismo año, Njiru (2011b) desarrolló la técnica LAMP combinada con la detección del producto amplificado empleando un dispositivo de flujo lateral (LFD) para

la detección de HAT. Este autor reportó mediante el ensayo LAMP-LFD una sensibilidad analítica de 0.01 Trip/mL, cuyo valor fue idéntico a los obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa y SYBR Green I. Sin embargo, LFD mostró superior sensibilidad que SYBR Green en muestras biológicas de hueso humano. El autor concluye que el uso de colorantes intercalantes no específicos puede generar falsos positivos, así mismo, el ensayo LAMP-LFD es simple, rápido y tiene gran potencial en el diagnóstico de HAT.

Recientemente se desarrollo la técnica LAMP para la detección de *T. vivax* basada en secuencias de ADN satelital, por Njiru y col. (2011c). Se evidenció una sensibilidad analítica de 1trip/mL, a diferencia de ensayos con PCR cuya sensibilidad fue de 10 a 10³trip/mL. El ensayo LAMP para la detección de este parásito fue rápido, robusto y simple con alto potencial para el diagnóstico de tripanosomosis animal en condiciones de campo.

Se ha aplicado la técnica LAMP a otras especies de interés veterinario tales como *Babesia sp.* (Ikadai y col., 2004), *L. donovani* (Takagi y col., 2009) y *Plasmodium sp.* (Kawai y col., 2010). Así como para la identificación de genomas virales, hongo patógenos y otros organismos.

En vista de que no existe ningún reporte hasta la fecha de la aplicación de la técnica LAMP para el diagnóstico de tripanosomosis causada por *T. vivax* a partir de la región catalítica de la cisteína proteasa de aislados venezolanos, se propone desarrollar esta técnica de amplificación para la detección de este agente patógeno.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Desarrollar la técnica de amplificación isotérmica de ADN mediado por asas (LAMP) para su aplicación en la detección de *Trypanosoma vivax* en ovinos infectados experimentalmente.

Objetivos específicos:

1. Infectar experimentalmente ovinos sanos con un aislado venezolano de *T. vivax* y realizar un seguimiento mediante técnicas parasitológicas y moleculares.
2. Diseñar, mediante herramientas bioinformáticas, los cebadores internos y externos de un ensayo LAMP sobre las secuencias internas del dominio catalítico de la cisteína proteasa de *T. vivax* con fines diagnósticos.
3. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y de los componentes de la mezcla de reacción *Tv*-LAMP, utilizando los cebadores específicos para su aplicación en la detección de *T. vivax*.
4. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la reacción *Tv*-LAMP en muestras de sangre de ovinos infectados experimentalmente.
5. Evaluar comparativamente la robustez de la reacción *Tv*-LAMP en diferentes condiciones de muestras de sangre provenientes de ovinos infectados experimentalmente.
6. Realizar un estudio comparativo de la sensibilidad y tiempo de la técnica *Tv*-LAMP con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Infección experimental en ovinos en estudio.

Se incluyeron en el estudio dos ovejos mestizos sanos de 1 año de edad, y de 20 Kg de peso. Uno de ellos se inoculó con 10^6 parásitos de *T. vivax* cepa Apure provenientes de sangre infectada a través de la vena yugular. Este aislado presenta un tamaño es de $21\mu\text{M}$ (Gómez, 2011) y fue obtenido inicialmente de un bovino infectado con *T. vivax* del Estado Apure. El segundo ovejo se utilizó como control negativo del proceso infeccioso.

Los ovejos permanecieron en un Bioterio con todas las condiciones adecuadas para su mantenimiento, con suministro de agua *ad libitum* y alimentados con pasto seco, contando además con la participación de personal veterinario abocado al seguimiento de la infección. Al cabo de dos semanas de estudio con los ovinos infectados se realizó el tratamiento post-infección con una dosis de 0,5mg/Kg de cloruro de isometamidium y 5mL de suplemento vitamínico para garantizar la sobrevivencia de los animales.

Para la infección experimental, el animal fue sujetado empleando buenas prácticas de laboratorio. Se realizó la inmunosupresión de los animales a infectar con el inóculo de *T. vivax*, aplicándoles dexametasona siguiendo el protocolo de 5 dosis de 2mg/Kg de forma interdiaria. Simultáneamente con la cuarta dosis se tomó una muestra de sangre a través de la vena yugular de los ovinos en tubos con anticoagulantes (EDTA) para el análisis de los ovejos en estudio previamente a la inoculación de los parásitos. Luego de dos días post-infección, se colocó la quinta dosis de dexametasona (García y col., 2005). Se tomaron muestras de sangre interdiario post-infección contando con la participación de la Lic.

Lucinda Tavares. Una alícuota de estas muestras se empleó para los ensayos parasitológicos y una segunda alícuota para la extracción del ADN genómico.

4.2. Técnicas parasitológicas.

El seguimiento parasitológico de los ovinos inoculados se realizó mediante una evaluación interdiaria post-infección empleando los métodos: Brener para el conteo de parásitos observando 100 campos (Brener, 1962), la técnica de MHC (Woo, 1969) y gota fresca (Desquesnes y Tresse, 1996).

4.2.1 Centrifugación de Microhematocrito (MHC) y Woo:

Para la MHC, las muestras de sangre de los ovinos en estudio fueron analizadas según Woo (1969). Para ello, se tomaron 70 μ L de sangre en un tubo capilar con EDTA (75 x 1.5mm). una vez sellado uno de los extremos del tubo capilar, se centrifugó a 3000xg durante 10min. Se determinó el porcentaje de glóbulos rojos presentes en la muestra (determinación de hematocrito) y posteriormente para la técnica de Woo se observó al microscopio con un aumento de 200X, la capa leucocitaria de las muestras de sangre tomadas, determinando la presencia o ausencia de los parásitos en sangre.

4.2.2 Gota fresca:

Para este estudio, se depositó una gota de sangre sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos. Se observó directamente la preparación al microscopio de luz con un aumento de 400X la presencia o ausencia de parásitos. Los tripanosomas fueron

reconocidos por su movimiento característico entre los glóbulos rojos inmóviles en el caso de las muestras positivas.

4.2.3 Cuantificación de parásitos en sangre por el método de Brener (1962).

El método usado para la cuantificación de parásitos, es una adaptación del método original descrito por Brener (1962). Para ello, se colocaron 5µL de la muestra de sangre en estudio en un portaobjetos y sobre la sangre un cubreobjetos (22mm x 22mm) presionando suavemente para permitir que la muestra se distribuya homogéneamente bajo la superficie del cubreobjetos. Posteriormente se contaron los parásitos en 100 campos, en un microscopio Leica® a un aumento de 400X y la parasitemia se expresó como el número de organismos/mL de sangre según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Organismos}}{\text{mL}} = \text{Oc} \times \text{Fm} \times \text{Fd}$$

Donde: **Oc** representa el número de organismos contados, **Fm** es el factor óptico del microscopio, factor de conversión cuyo valor está relacionado con el área de visión y el número de campos observados al microscopio a un aumento 400X. Para este caso en particular, el Fm= 5824 microscopio Leica®. Finalmente **Fd** es el factor de dilución de la muestra.

4.3 Obtención de ADN genómico.

El ADN genómico fue aislado utilizando el estuche comercial Promega “Wizard® Genomic DNA Purification, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Brevemente partiendo de 300µL de muestra de sangre se agregaron 900µL de la solución de lisis celular en un tubo de centrifuga de 1,5mL, mezclando por inversión para la ruptura celular de los glóbulos rojos y glóbulos blancos. La mezcla fue incubada por 10 min a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo periódicamente, seguida de una centrifugación por 20seg a 16000xg (Thermo electron corporation). El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el sedimento en un agitador mecánico (Digisyttml). Seguidamente, se añadieron 300µL de la solución de lisis nuclear mezclando hasta formar una solución viscosa. Posteriormente se agregó 1,5µL de RNAsas y se mezcló suavemente por inversión. Seguido de una incubación con ARNasa (15min a 37°C y 5min a temperatura ambiente). Posteriormente, las proteínas fueron precipitadas añadiendo 100µL de solución de precipitación de proteínas y removiendo la mezcla en el agitador mecánico por 20seg aproximadamente hasta observar los pequeños agregados de proteínas. La mezcla fue centrifugada por 3min a 16000xg (observándose un sedimento marrón oscuro), transfiriendo el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1,5mL para la precipitación de los ácidos nucleicos con 300µL de isopropanol, seguida de una centrifugación por 5min a 16000xg descartando el sobrenadante. El sedimento fue lavado con 300µL de etanol al 70% y centrifugado a 16000xg por 1min. El sedimento fue secado al vacío (Speedvac) por 10min a 65°C e hidratado con 100µL de agua bidestilada por 1 Hora a 60°C. Las muestras fueron rotuladas y preservadas en nevera a 4°C hasta su análisis molecular.

4.4 Técnicas moleculares

4.4.1 Reacción LAMP

4.4.1.1 Diseño de cebadores de la reacción *Tv*- LAMP.

La secuencia de 684pb de la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* de aislados venezolanos fue el blanco genómico escogido para el diseño de los cebadores de

la reacción LAMP (Figura 10) (Resultado no publicado de González, 2011). Para ello, se empleó el software *PrimerExplorer V3* disponible en la web (<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>).

```

1  GTGAGGACGC TGGTGCAGGT GCCGCCGGGC AAGGCCCCCG CCGCCCTGGA CTGGCGCCGC AAGGTTGGCG TGACGCCCGT  80
   *****
81  CAAGGACCAG GGCACCTGCG GCTCCTGCTG GTCCTTCTCC GCCATTGGGA ACATCGAGGG CCAGTGGGGC GCTGCCGGCA  160
   *****
161. ACCCGCTGAC GAGTCTGTCG GAGCAGATGC TTGTGTCGTG CGATTTC AAG GACAATGGGT GCGGTGGTGG TTTCATGGAC  240
   *****
241  AACGCATTCC AGTGGATCGT GAAGGAGAAC AGTGGCAAGG TGTACACGGA GAAGAGCTAT CCCTACGTCT CCGAGGACCG  320
   *****
321  TAGTAAGCCG TTCTGTATTG CTTACGGGCA CGAGGTCGGT GCCACGATCA CCGGCCACGT GGACATCCCG CACGACGAGG  400
   *****
401  ACGCCATCGC CAAGTACCTC GCCGACAACG GCCCGGTGCG TGTGGCCGTG GACGCCACCA CCTTCATGTC GTACAGTGGC  480
   *****
481  GGTGTGGTGA CGTCTGCAC CTCGAGGGCG CTGAACCACG GCGTGTCTCT CGTGGGTCTAC AACGACAGCA GCAAGCCCGC  560
   *****
561  GTACTGGATC ATCAAGAACT CGTGGAGCTC GTCGTGGGGC GAGAAGGGCT ACATCCGCAT CGAGAAGGGC ACGAATCAGT  640
   *****
641  GTCGTGGTGC GCAGCTCGCG TCGAGTGTG TTGTGGTGG CCCC  684
   *****

```

Figura 10. Secuencia nucleotídica de la RcCp de *T. vivax*. Se muestra la secuencia nucleotídica de la hebra sentido de la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* (684pb) empleada para el diseño de cebadores requeridos en la reacción LAMP y PCR. (Cortesía de M. Gonzatti).

Para diseñar los cebadores se consideraron los siguientes puntos citados en <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>:

- A. 1- La espaciación en relación a ubicación y distancia entre los dos pares de cebadores requeridos en la reacción LAMP (Notomi y col., 2000). La distancia entre el extremo 5' del cebador F2 y B2 la cual debe oscilar en un rango de 120 a 160 pb (Figura 11).

2- La distancia entre F2 y F3 así como entre B2 y B3 debe encontrarse en un rango de 0 a 60 pb (Figura 11).

3- La distancia para las regiones formadoras de las asas específicamente entre el extremo 5' de F2 al extremo 3' de F1 y del extremo 5' de B2 al extremo 3' de B1 debe ser entre 40 y 60 pb (Figura 11).

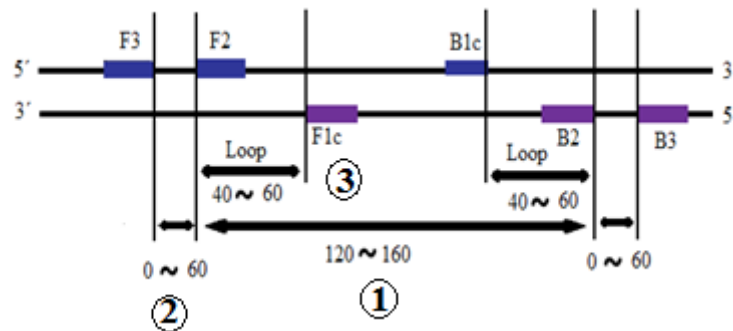


Figura 11. Espaciación en relación a la distancia y ubicación de los cebadores en la región del ADN blanco. Se muestran con los números 1, 2 y 3 las distancias entre las seis regiones distintas sobre el ADN blanco donde se ubican los cebadores en la reacción LAMP.

B- La temperatura de fusión T_f o T_m (del inglés *melting*) de los cebadores debe oscilar en un rango de 60 a 65°C para secuencias ricas en GC; y alrededor de 55 a 60°C para secuencias ricas en AT. En este caso, la secuencia que se quiere amplificar (Figura 10) es rica en GC con un porcentaje de 63,9 % (*Oligo Explorer 1.1.2*), por lo que se tomó como rango de temperatura de 60 a 65°C para el diseño de cebadores.

C- La estabilidad calculada para los extremos de los cebadores en las regiones 5' de F1c/B1c y el extremo 3' de F2/B2 así como F3/B3 debe ser menor que -4kcal/mol.

D- Los cebadores deben diseñarse de forma tal que no puedan formar estructuras secundarias fácilmente, por lo que el extremo 3' de la secuencia en cada cebador no debería ser rica en AT o complementaria al resto de los cebadores.

Una vez generados el conjunto de cebadores por el software *PrimerExplorer V3*, se procedió al análisis comparativo de la secuencia de cada uno de ellos mediante herramientas bioinformáticas, empleando para ello la página web *PUBMED (Blast del inglés Basic Local Alignment Search Tool)*, con el fin de determinar la identidad de éstos con la secuencia de la RcCp y determinar si existía homología o no con otras especies, escogiéndose aquellos conjuntos con mayor grado de identidad con esta región en *T. vivax*.

4.4.1.2 Prueba de funcionalidad de los cebadores de la reacción *Tv*-LAMP mediante PCR para la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente.

La evaluación de la integridad de los cebadores FIB/BIP y F3/B3 se realizó mediante un ensayo de PCR empleando los cebadores seleccionados a partir del análisis de secuencia llevado a cabo empleando las herramientas bioinformáticas.

Los ensayos de PCR fueron ejecutados en un termociclador Eppendorf, en un volumen total de reacción de 25 μ L, conteniendo: 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM KCl, 0,1% Tritón-X, 25 μ M MgCl₂, 200 μ M de dNTP_s, 10 μ M de los cebadores BIP/FIP y F3/B3, 1U de Platinum *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y ADN genómico obtenido de los ovinos infectados. El termociclador fue programado para generar las siguientes condiciones de reacción: una pre-incubación por un período de 5 min a 95°C, seguida de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales con 1 min a 95°C, 1 min en gradiente de temperatura de hibridación (60, 61, 62, 63, 64 y 65°C) y 1 min a 72°C, con un período final de extensión de 10 min a 72°C. Una alícuota (10 μ L) de cada producto de PCR se evaluó por electroforesis en geles de agarosa 2%, teñido con SYBER Safe. Se realizó

fotodocumentación de los geles de agarosa utilizando un equipo transiluminador de luz UV (Unitec).

4.4.1.3 Estandarización de la reacción *Tv*-LAMP.

Para la estandarización de la reacción LAMP se utilizó la enzima *Bst* polimerasa de *New England Biolabs* 8U/ μ L, $MgCl^{+2}$ y Betaína (*Sigma*) y Buffer ThermoPol (20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM KCl, 2mM $MgSO_4$. 0.1% Triton X-100, pH 8.8). Para ello se consideraron los siguientes factores: temperatura de reacción, concentración de magnesio (Mg^{+2}), betaína y dNTPs en la mezcla de reacción tomando como referencia los valores reportados en la literatura (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la técnica LAMP.

Componente de la mezcla	Especificación de cantidades finales	Reportado por:
MgSO₄	2mM - 8mM	Notomi y col, 2000; Mori y col.; 2001; Kuboki y col., 2003; Nijiru y col., 2008a; Nijiru y col., 2008b;
Cebadores internos (BIP-FIP)	0.8 μ M – 2 μ M	Notomi y col, 2000; Mori y col.; 2001; Nijiru y col., 2008a; Nijiru y col., 2008b;
Cebadores externos (F3 y B3)	0,2 μ M	Notomi y col., 2000; Mori y col.; 2001; Nijiru y col., 2008a; Nijiru y col., 2008b.
dNTPs	100 μ M- 200 μ M	Notomi y col, 2000; Nijiru y col., 2008a; Nijiru y col., 2008b.
Betaína	0.8M – 1,6M	Notomi y col, 2000; Mori y col.; 2001; Thekisoe y col.,2005; Thekisoe y col., 2008; Kuboki y col., 2003; Nijiru y col., 2008a
<i>Bst</i> DNA polimerasa	8U/reacción	Notomi y col, 2000; Thekisoe y col.,2005; Thekisoe y col., 2008; Notomi y col, 2000; Kuboki y col., 2003; Nijiru y col., 2008 ^a
Buffer de reacción	20 mM Tris–HCl (pH8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100	Notomi y col, 2000; Nijiru y col., 2008a; Nijiru y col., 2008b;

En el protocolo para la estandarización de las condiciones óptimas se evaluaron conjuntamente las temperaturas 61, 63 y 65°C, las concentraciones de Mg^{+2} 2mM, 4mM y 6mM y adicionalmente tres concentraciones de ADN genómico total, 100ng/ μ L, 200ng/ μ L y 300ng/ μ L.

En la determinación de la concentración óptima de dNTPs se evaluaron concentraciones finales de 50, 100 y 200mM, seguido de la evaluación de cuatro concentraciones de betaína 0,8M, 1M, 1,2M y 1,6M.

Previamente a la adición de los componentes de la mezcla de reacción, el ADN extraído de los ovejitos en estudio fueron precalentados a 95°C por 10min y colocados en frío por 5min. Posteriormente, se realizó la adición del ADN a la mezcla de reacción, seguido por incubación al rango de temperatura entre 60 a 65°C y un tiempo de incubación de 30 a 90min. Para detener la reacción, se calentó la mezcla a 80°C por 10min para inactivar la enzima (Notomi y col., 2000).

4.4.1.4 Análisis del producto de amplificación LAMP.

El análisis del producto de amplificación se inició con la evaluación de 10µL de mezcla de reacción LAMP por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen, UltraPure™ Agarose), y tinción con SYBER Safe™ DNA diluido 1/1000 (Molecular Probes, Eugene Oregon, EUA) (Notomi y col., 2000). Así mismo, el producto fue detectado visualmente directamente en el tubo de reacción por Turbidimetría derivada por la formación de precipitado de pirofosfato de magnesio descrito por Mori y col. (2001) y por la visualización directa de fluorescencia mediante la adición de 1µL de SYBR Green diluido 1/10 a la mezcla de reacción post-amplificación (Poon y col., 2006; Párida y col., 2008).

4.4.1.5 Determinación de la sensibilidad y especificidad de la reacción

LAMP.

Para determinar la sensibilidad analítica de la reacción LAMP se realizaron diluciones seriadas de la muestra de sangre proveniente de los animales infectados en el pico de parasitemia utilizando agua destilada. Partiendo de la cantidad de parásitos determinada en el pico de parasitemia ($5,6 \times 10^6$ tryp/mL, se calculó la concentración de ADN del parásito tomando en cuenta que un parásito contiene 0,1pg de ADN (Fernández y col., 2009). Las diluciones seriadas partieron de una concentración de 100 pg/L hasta una concentración de 0,0001 pg/ μ L. Este ensayo LAMP fue comparado con los ensayos de PCR descritos en la sección 4.6, empleando las mismas diluciones seriadas.

Para determinar la especificidad de la reacción LAMP se evaluaron muestras de cada una de las siguientes especies: ADN proveniente de un ovino infectado con *T. vivax*; ADN purificado de: *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. congolense*; *L. donovani*, ratón y de ovino sano.

4.4.1.6 Robustez de la reacción LAMP.

Con la finalidad de determinar la eficacia de la técnica LAMP en condiciones óptimas de incubación para la identificación de ADN de *T. vivax* a partir de muestras de sangre proveniente de un ovino en pico de parasitemia bajo distintas condiciones de extracción, se realizaron los ensayos mencionados en la tabla 2:

Tabla 2. Evaluación de la robustez. Diferentes condiciones a tratar.

Tipo de muestra	Condiciones de tratamiento		
	Centrifugación (Obtención de la capa blanca)	Pre calentamiento	Extracción de ADN
Sangre Completa	No	No	Si
Sangre Completa	Si	No	Si
Sangre Completa	No	No	No
Sangre Completa	Si	No	No
Sangre Completa	Adición de Buffer de lisis		

1µL de cada una de las condiciones de tratamiento fue utilizada en la reacción LAMP en las condiciones óptimas de amplificación.

4.4.2 Comparación de la técnica LAMP con la PCR.

Para la evaluación comparativa del ensayo *Tv*-LAMP se utilizó el ensayo de PCR basado en la región catalítica de *T. vivax* realizado por González (2011) (Resultados no publicados).

Los ensayos de PCR fueron ejecutados en un volumen total de reacción de 25 µL, conteniendo: 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM KCl, 0,1% Tritón-X, 25µM MgCl₂, 200µM de deoxi-ribonucleótidos trifosfatos (dNTP_s), 10µM de los cebadores *TvRcCp* (F/R), 1U de Platinum *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y ADN genómico obtenido de los ovinos infectados. El termociclador fue programado para generar las siguientes condiciones de reacción: una pre-incubación por un período de 5 min a 95°C, seguida de 32 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales con 1min a 95°C, 1min a 64°C y 1min a 72°C, con

un período final de extensión de 10 min a 72°C. Una alícuota (10 µL) de cada producto de PCR se evaluó por electroforesis en geles de agarosa 2%, teñido con SYBER Safe. Se realizó fotodocumentación de los geles de agarosa utilizando un equipo transiluminador de luz UV (Unitec).

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden dividir en tres secciones cada una vinculadas a los objetivos específicos descritos en el punto 3 (página 29) que incluyen: el seguimiento mediante técnicas parasitológicas de la infección experimental con *T. vivax*, el diseño de cebadores de la reacción LAMP mediante herramientas bioinformáticas y el desarrollo de un ensayo LAMP para su aplicación en la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente.

5.1. Evaluación de parámetros clínicos y parasitológicos del ovino infectado con *T. vivax*.

El seguimiento de la infección experimental del ovino empleando el aislado venezolano de *T. vivax* cepa Apure, se realizó mediante las técnicas parasitológicas MHC y gota fresca, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos.

Durante el curso de esta infección con *T. vivax*, se distinguieron únicamente la fase de prepatencia y la fase aguda de la enfermedad. No se pudo observar la fase crónica de la enfermedad debido a que el animal no sobrevivió al proceso de infección. Al inicio de este estudio, el ovino infectado manifestó valores de temperatura normal (anexos, Tabla 6) que corresponden a la fase de prepatencia de la infección o al período de incubación del parásito, el cual abarco desde el día 1 al 3^{er} día post-infección (Tabla 3). Luego de este período prepatente, se observó la fase aguda de la enfermedad que abarcó desde el día 3 al día 13 post-infección (Tabla 3). Este período se caracterizó por la presencia de parásitos en sangre a los 3 días post-infección empleando la técnica de Woo, a diferencia de lo observado con la técnica de gota fresca, donde los parásitos fueron observados a los 9 días

post-infección (Tabla 3). Se observaron parasitemias en el orden de 10^5 y 10^6 tryp/mL, siendo el pico de parasitemia de 5.9×10^6 p/mL correspondiente al día 13 post-infección (Tabla 3).

En cuanto a la temperatura corporal, durante la fase de prepatencia el ovino infectado no superó su punto crítico de 40°C descrito para esta especie en particular (anexos, Tabla 6), una vez detectado el parásito en sangre, el animal infectado mostró un aumento en los valores de temperatura corporal desde el día 3 al día 13 post-infección, con valores que oscilan entre los 39.5°C a los 40.8°C , hallándose la máxima temperatura registrada durante todo el período de evaluación para el día 13, lo que coincide con el aumento de la parasitemia (Tabla 3), encontrándose para estos días la temperatura del ovino en su punto crítico y en algunos casos superior a este (anexos, Tabla 6).

En cuanto al hematocrito, es importante destacar que el ovino presentaba inicialmente el hematocrito en 22% siendo normalmente superior a 30%, ya que se le diagnosticó un parásito intestinal denominado *Haemonchus contortus*. Sin embargo fue tratado previamente antes de la infección con *T. vivax*. Durante la infección experimental con *T. vivax*, el ovino infectado mostró un valor mínimo de 18% para el día 13 post-infección (Tabla 3).

Tabla 3. Seguimiento de la infección experimental del ovino mediante técnicas parasitológicas.

		Días	Hto (%)	Temp. (°C)	Woo	Gota fresca	Contaje de parásitos por Brener (x10 ⁶ p/mL)	Observaciones
Pre- infección	Inmunosu- presión e inoculación de parásitos	Día 1	22	38	(-)	(-)	-----	Inmunosupresión (2mg/kg dex.) 1° dosis
		Día 3	22	ND	(-)	(-)	-----	Inmunosupresión (2mg/kg dex.) 2°dosis
		Día 5	22	ND	(-)	(-)	-----	Inmunosupresión (2mg/kg dex.) 3°dosis
		Día 7	22	ND	(-)	(-)	-----	Inmunosupresión (2mg/kg dex.) 4° dosis. Inóculo 10 ⁶ p/mL de <i>T. vivax</i>
Post- Infección	Período prepatente	Día 1	21	38.5	(-)	(-)	-----	Inmunosupresión (2mg/kg dex.) 5°dosis
		Día 3	20	39.5	(+)	(-)	-----	-----
	Fase Aguda	Día 5	21	40.5	(+)	(-)	-----	-----
		Día 7	20	40	(+)	(-)	-----	-----
		Día 9	21	39.8	(+)	(+)	0,58	-----
		Día 11	19	40.2	(+)	(+)	1,20	-----
		Día 13	18	40.8	(+)	(+)	5,9	Pico de parasitemia. Aplicación de tratamiento con isometamidium y suplemento vitamínico
		Día 15	Muerte del animal					

(Hto) Hematocrito; (Temp.) Temperatura; (-) Muestra de sangre negativa; (+) Muestra de sangre positiva; (ND) No determinado; (p) Parásitos; (c) Campo. (Dex.) Dexametasona.

5.2. Técnica LAMP.

5.2.1. Diseño de cebadores de la Reacción *Tv*-LAMP.

Los cebadores de la reacción LAMP fueron diseñados empleando el software *PrimerExplorer V3* basados en la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* tomando en cuenta los criterios descritos en la sección de materiales y métodos.

Una vez introducida la secuencia en estudio (Figura 10) en el software libre disponible en la web, se generaron un conjunto de secuencias que comprenden las regiones F3, B3, FIP y BIP requeridas en la reacción LAMP. Cada una de estas secuencias fue

analizada mediante herramientas bioinformáticas empleando para ello la base de datos NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Las secuencias elegidas como cebadores en este estudio fueron aquellas que presentaron un 100% de similitud con la secuencia blanco (anexo 2). Así mismo, los cebadores de este estudio fueron elegidos de forma tal que las temperaturas de fusión (T_m) se encontraran dentro de los rangos descritos por Notomi y col., (2000) (Tabla 4), cuyas temperaturas oscilan entre 60 y 65°C. La temperatura de las secuencias F1c y B1c son superiores a la de las secuencias F2 y B2, tal y como fue descrito por Notomi y col., (2000) (Tabla 4). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4, y la localización de estos sobre la secuencia de la RcCp de *T. vivax* se muestra en la Fig. 12.

Tabla 4. Cebadores seleccionados para la reacción LAMP en la detección de *T. vivax*

Cebador	Posición 5'	Posición 3'	Longitud	Tm	%GC	Secuencia
F3	274	291	18nt	59.18	61	GGCAAGGTGTACACGGAG
B3	490	505	16nt	60.04	69	CGGAGGTGCAGGACGT
FIP	-	-	44nt	-	-	GTGATCGTGGCACCGACCTC- TTTT- CTCGGAGGACGGTAGTAAGC
BIP	-	-	42nt	-	-	GCCATCGCCAAGTACCTCGC- TTTT-CCGCCACTGTACGACATG
F2	309	328	20nt	60.83	60	CTCGGAGGACGGTAGTAAGC
F1c	352	371	20nt	64.66	65	GTGATCGTGGCACCGACCTC
B2	465	482	18nt	59.52	61	CCGCCACTGTACGACATG
B1c	403	442	20	65.33	65	GCCATCGCCAAGTACCTCGC

F3: Cebador externo forward; B3: Cebador externo backward; FIP: Cebador interno forward; BIP: cebador interno backward. Las secuencias F2 y F1c forman el cebador interno forward (FIP), y las secuencias B2 y B1c forman el cebador interno backward (BIP)

```

1 GTGAGGACGC TGGTGCAGGT GCCGCCGGGC AAGGCGCCCG CCGCCGTGGA CTGGCGCCGC AAGGGTGCGG TGACGCCCGT 80
*****
81 CAAGGACCAG GGCACCTGCG GTCCTCTGTG GTCCTTCTCC GCCATTGGGA ACATCGAGGG CCAGTGGGCG GCTGCCGGCA 160
*****
161. ACCCGCTGAC GAGTCTGTCC GAGCAGATGC TTGTGTCGTG CGATTTC AAG GACAATGGGT GCGGTGGTGG TTTCATGGAC 240
*****
241 AACGCATTCC AGTGGATCGT GAAGGAGAAC AGTGGCAAGG TGTACACGGA GAAGAGCTAT CCCTACGCTT CCGAGGACGG 320
*****
F3 F2
321 TAGTAAGCCG TTCGTATTCC CTTACGGGCA CGAGGTCGGT GCCACGATCA CCGGCCACGT GGACATCCCG CACGACGAGG 400
*****
F1c
401 ACGCCATCGC CAAGTACCTC GCCGACAACG GCCCGGTGCG TGTGGCCGTT GACGCCACCA CCTTCATGTC GTACAGTGGC 480
*****
B1c B2
481 GGTGTGGTGA CGTCTGTGAC CTCGAGGCG CTGAACCACG GCGTGTCTCT CGTCGGCTAC AACGACAGCA GCAAGCCGCG 560
*****
B3
561 GTACTGGATC ATCAAGAACT CGTGGAGCTC GTCGTGGGGC GAGAAGGGCT ACATCCGCAT CGAGAAGGGC ACGAATCAAT 640
*****
641 GTCGTGGTGGC GCAGCTCGCG TCGAGTGTG TTGTGGTGG CCCC 684
*****

```

Figura 12. Localización de los cebadores del ensayo TvLAMP en la secuencia nucleotídica de la región catalítica cisteína proteasa de *T. vivax*. Se muestra la secuencia nucleotídica de la hebra sentido de la RcCp de *T. vivax* (684pb) y la ubicación de los cebadores diseñados.

5.2.2 Prueba de funcionalidad de los cebadores de la reacción Tv-LAMP mediante PCR.

Una vez seleccionados los cebadores a utilizar en el ensayo Tv-LAMP se evaluó la funcionalidad de los oligos internos y externos mediante una reacción de PCR. Este ensayo se realizó con el fin de evaluar la integridad de los oligos de la reacción Tv-LAMP, así como, determinar la mejor temperatura a la cual amplifican dichos cebadores. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. Los cebadores internos (BIP y FIP) analizados por PCR mostraron amplificación a todas las temperaturas evaluadas (Figura 13, Gel A, 60, 61, 62, 63, 64 y 65°C) generando la banda esperada de 174pb. Sin embargo, se observa mejor amplificación a 64 y 65°C. Por otra parte, al evaluar los cebadores

externos (F3 y B3) se obtuvo la banda esperada de 232pb a todas las temperaturas evaluadas (Figura 13, Gel B 62, 63, 64 y 65°C).

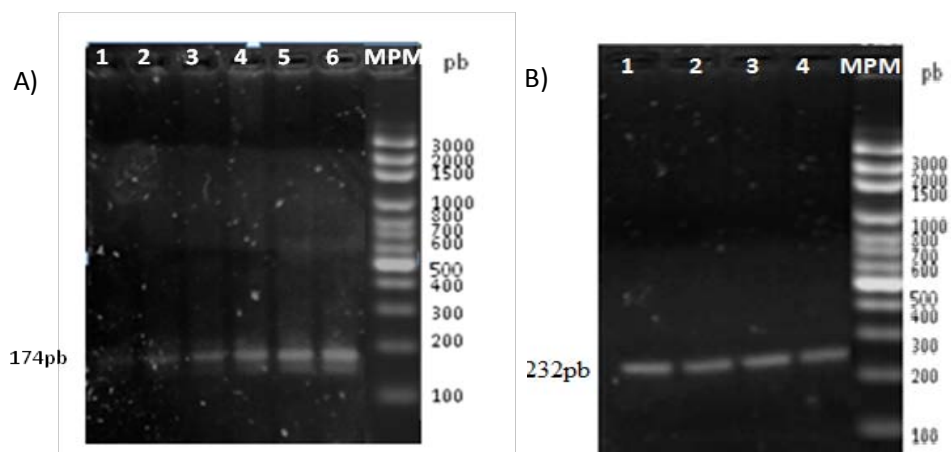


Figura 13. Evaluación de la funcionalidad de los oligos de la reacción *Tv*-LAMP (BIP/FIP y F3/B3) mediante un ensayo de PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación por PCR empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3. **Gel A)** Carril 1: ADN *OI-T. vivax* (60°C- FIP/BIP); Carril 2: ADN *OI-T. vivax* (61°C- FIP/BIP); Carril 3: ADN *OI-T. vivax* (62°C- FIP/BIP); Carril 4: ADN *OI-T. vivax* (63°C- FIP/BIP); Carril 5: ADN *OI-T. vivax* (64°C- FIP/BIP); Carril 6: ADN *OI-T. vivax* (65°C- FIP/BIP); MPM: Ladder 100pb. **Gel B)** Carril 1: ADN *OI-T. vivax* (62°C- F3/B3); Carril 2: ADN *OI-T. vivax* (63°C- F3/B3); Carril 3: ADN *OI-T. vivax* (64°C- F3/B3); Carril 4: ADN *OI-T. vivax* (65°C- F3/B3); MPM: 100pb.

5.3. Desarrollo de un ensayo LAMP para la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente.

Con el objetivo de optimizar las distintas condiciones y los diferentes componentes o reactivos utilizados en la reacción *Tv*-LAMP, se realizaron diferentes ensayos de variaciones de temperatura, concentraciones de cebadores, dNTPs y betaína, tomando como muestras positivas ADN total extraído de sangre infectada del ovino con una parasitemia de $5,6 \times 10^6$ trip/mL para el día 13 post-infección.

5.3.1. Determinación de las condiciones óptimas de temperatura y Mg^{+2} de la reacción *Tv*-LAMP.

Los resultados del primer experimento de la estandarización de la reacción LAMP se muestran en la Figura 14. El primer ensayo dirigido a la determinación de la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores y concentración de Mg^{+2} consistió en la variación de las temperaturas de reacción (61, 63 y 65 °C) y un rango de concentraciones de magnesio (2, 4 y 6 mM), obteniéndose el patrón de escalera característico de la reacción LAMP indicando la formación de las estructuras de tallo-asas descrita por Notomi y col. (2000). Sin embargo, se observaron problemas de falsos positivos en los controles de agua y ADN del ovino sano a 61 y 63°C (Figura 14, Gel B, Carriles 1, 2 y 3). Sólo a 65°C se obtuvo el resultado esperado en los controles negativos (Figura 14, Gel B, carriles 8 y 9). Este primer resultado nos alertó la consideración de contaminación asociado a la alta sensibilidad en la reacción LAMP. En cuanto a la temperatura de 65°C, sólo amplificó la muestra control positiva, obteniéndose mejores resultados a ésta temperatura (Figura 14, Gel B, carriles 6 y 7).

La evaluación de las concentraciones de Mg^{+2} mostró una amplificación a partir de 4 milimolar (mM) a todas las temperaturas evaluadas (Figura 14, Gel A, carriles 2 y 3; 5 y 6; Gel B, carriles 6 y 7). No se obtuvo amplificación a 2mM de Mg^{+2} a ninguna de las temperaturas empleadas (Figura 14, Gel A, carriles 1 y 4; Gel B, carril 5). La concentración de magnesio seleccionada para llevar a cabo el resto de los experimentos fue de 4mM.

5.3.2. Determinación de las condiciones óptimas de dNTPs en la reacción *Tv*-LAMP.

Posteriormente, se realizó un ensayo para evaluar la concentración óptima de dNTPs en un rango de 50 μ M a 200 μ M. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15. A una concentración de 50 μ M no hubo amplificación del templado en la reacción (Figura 15, Carril 1), Sin embargo, a concentraciones de 100 y 200 μ M se observó amplificación del producto con el patrón típico de la reacción (Figura 15, carril 2 y 3), sugiriendo que ambas concentraciones pueden ser utilizada en la reacción para la detección de *T. vivax* empleando al marcador molecular propuesto en este estudio.

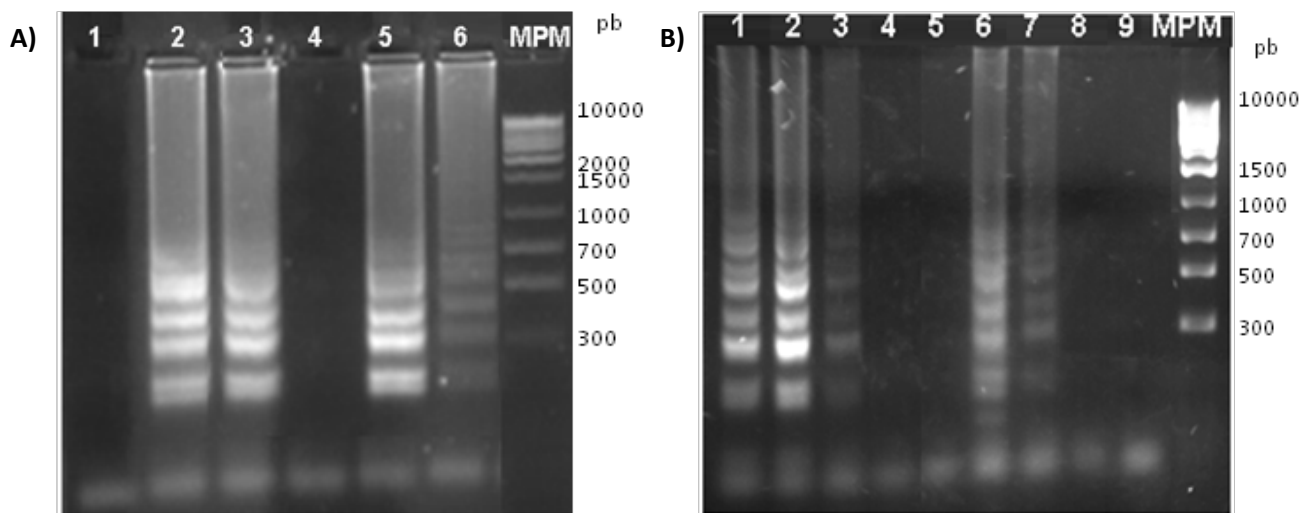


Figura 14. Determinación de las condiciones óptimas de temperatura y concentraciones de Mg^{+2} en la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles. **Gel A)** Carril 1: ADN OI-*T. vivax*- 2mM Mg^{+2} - 61°C; Carril 2: ADN OI-*T. vivax*- 4mM Mg^{+2} - 61°C; Carril 3: ADN OI-*T. vivax*- 6mM Mg^{+2} - 61°C; Carril 4: ADN OI-*T. vivax*- 2mM Mg^{+2} - 63°C; Carril 5: ADN OI-*T. vivax*- 4mM Mg^{+2} - 63°C; Carril 6: ADN OI-*T. vivax*- 6mM Mg^{+2} - 63°C; MPM: Ladder 1Kb. **Gel B)** Carril 1: ADN ovino sano-61°C; Carril 2: H₂O-61°C; Carril 3: ADN ovino sano-63°C; Carril 4: H₂O-63°C; Carril 5: ADN OI-*T. vivax*- 2mM Mg^{+2} - 65°C; Carril 6: ADN OI-*T. vivax*- 4mM Mg^{+2} - 65°C; Carril 7: ADN OI-*T. vivax*- 6mM Mg^{+2} -65°C; Carril 8: ADN ovino sano-65°C; Carril 9: H₂O; MPM: 1Kb.

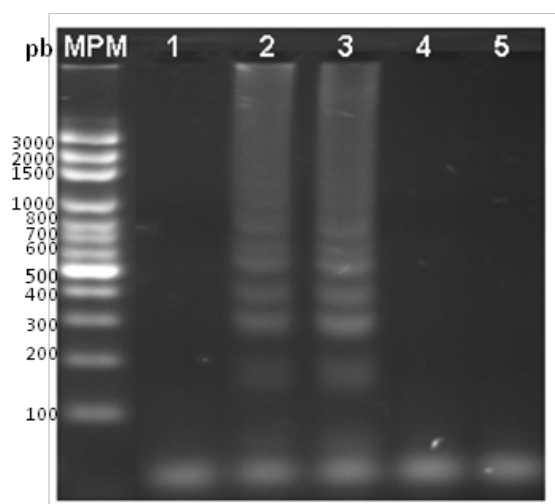


Figura 15. Optimización de la concentración de dNTPs en la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles. Carril 1: ADN OI- *T. vivax*- 50 μ M dNTPs; Carril 2: ADN OI-*T. vivax*- 100 μ M dNTPs; Carril 3: ADN OI- *T. vivax*- 200 μ M dNTPs; Carril 4: ADN ovino sano; Carril 5: H₂O; Carril 7: MPM 100pb.

5.3.3. Determinación de las condiciones óptimas de Betaína en la reacción *Tv*-LAMP.

Para el ensayo de la determinación de la concentración óptima de betaína en la mezcla de reacción, se varió la concentración de la misma en un rango de 0,8 a 1,6 M. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. La variación de la concentración de betaína no afectó la reacción LAMP, ya que se observó amplificación del ADN de *T. vivax* a cada una de las concentraciones empleadas, indicando que la concentración óptima puede ser cualquiera de las utilizadas en este ensayo. Sin embargo, la ausencia de betaína en la mezcla de reacción no permite la amplificación de la secuencia blanco (resultados no mostrados). Se tomó como concentración de betaína 1M para los próximos ensayos.

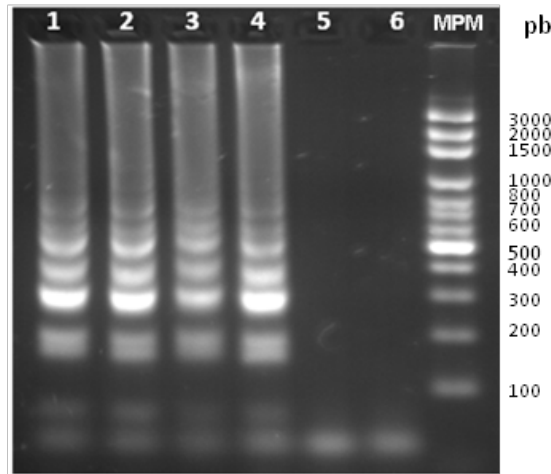


Figura 16. Optimización de la concentración de Betaína en la reacción *Tv*-LAMP.

Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg²⁺, 100µM de dNTPs). Carril 1: ADN OI-*T. vivax*- 0.8M de betaína; Carril 2: ADN OI- *T. vivax*- 1M de betaína; Carril 3: ADN OI- *T. vivax*- 1,2M de betaína; Carril 4: ADN OI- *T. vivax*- 1,6M de betaína; Carril 5: ADN ovino sano; Carril 6: H₂O; Carril 7: MPM 100pb.

5.3.4. Determinación de las condiciones óptimas de concentración de ADN en la reacción *Tv*-LAMP.

Para la determinación de la concentración de ADN genómico óptima para el ensayo *Tv*LAMP se evaluó la concentración de ADN como una variable que afecta el desempeño de la reacción *Tv*LAMP, se tomó un rango de ADN total de 100 a 300ng. Como se muestra en la Figura 17, las concentraciones de 100 y 200ng de ADN de ovino infectado con *T. vivax* presentan una amplificación correspondiente a la secuencia blanco en la muestra (Figura 17, carriles 1 y 2). Sin embargo, a 300ng de ADN proveniente del ovino infectado hay inhibición (Figura 17, carril 3). La concentración óptima de ADN genómico determinada en este estudio fue de 200ng.

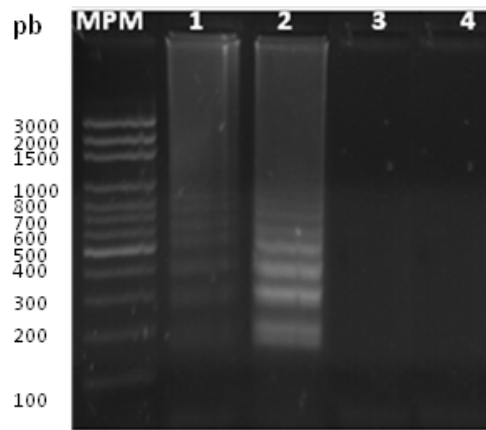


Figura 17. Optimización de la concentración de ADN genómico proveniente de un ovino infectado con *T. vivax* en la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*-LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg⁺², 100μM de dNTPs, 1M de Betaina). Carril 1: 100ng de ADN OI-*T. vivax*; Carril 2: 200ng de ADN OI- *T. vivax*; Carril 3: 300ng de ADN OI- *T. vivax*; Carril 4: H₂O; MPM: 100pb.

5.3.5. Detección del producto de amplificación del ensayo *Tv*-LAMP.

Los diferentes métodos de detección del producto amplificado por la reacción LAMP empleados en este estudio fueron la electroforesis en gel de agarosa, en el cual se observó el patrón típico del producto LAMP descrito por Notomi y col. (2000) (Figura 18, carril 1), detección mediante la adición de SYBR Green, donde una reacción positiva se evidenció mediante un cambio de color de naranja a verde directamente en el tubo de reacción (Mori y col., 2001; Poon y col., 2006) (Figura 19), así como la detección mediante la observación de la formación del precipitado pirofosfato de magnesio en el tubo de reacción (Mori y col., 2001) (Figura 20).

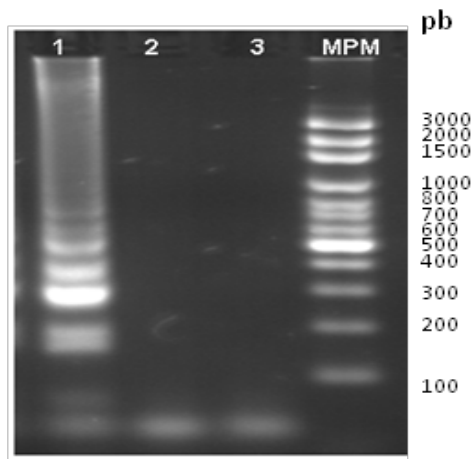


Figura 18. Detección del producto amplificado por *Tv*-LAMP empleando electroforesis en gel de agarosa. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg⁺², 100µM de dNTPs, 1M de Betaina). Carril 1: ADN ovino infectado con *T. vivax*; Carril 2: ADN ovino sano; Carril 3: H₂O; MPM: 100pb.

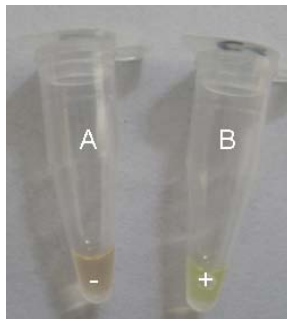


Figura 19. Detección del producto amplificado por *Tv*-LAMP empleando SYBR Green. Adición de 1µL de SYBR Green diluido 1/10, al producto final de la reacción LAMP. A) ADN ovino sano; B) ADN *T. vivax* H₂O.

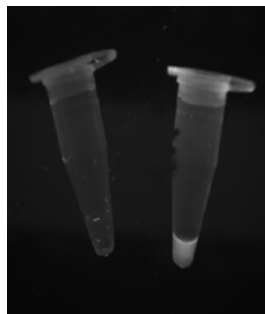


Figura 20. Detección del producto amplificado por *Tv*-LAMP mediante la formación de precipitado de magnesio. Adición de 1µL de SYBR Green diluido 1/10, al producto final de la reacción LAMP. A) ADN ovino sano; B) ADN *T. vivax* H₂O.

5.3.6. Condiciones óptimas de la reacción *Tv*-LAMP.

Una vez realizados todos los ensayos de estandarización se determinó que las condiciones óptimas del ensayo *Tv*-LAMP para su aplicación en la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente son las mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones óptimas de la reacción *Tv*-LAMP.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN				CONDICIONES DE INCUBACIÓN	
Componentes	Conc. inicial	Conc. final	Vol. (µL)	Tiempo (min)	Temp. (°C)
Buffer (<i>Bst pol.</i>)	10X	1X	2.5	60	65
MgSO ₄	50mM	2mM	1		
dNTPs	10mM	100µM	0.25		
FIP	10 µM	0.8 µM	2		
BIP	10 µM	0.8 µM	2		
F3	10 µM	0.1 µM	0.25		
B3	10 µM	0.1 µM	0.25		
Betaína	5M	1M	5		
H ₂ O	-	-	8.75		
<i>Bst Pol.</i>	8U/ µL	8U	1		
ADN	100ng/ µL	200ng	2		
Total	-	-	25		

5.3.7. Comparación de sensibilidad de las técnicas *Tv*-LAMP y PCR.

Se determinó la sensibilidad de los cebadores de la reacción *Tv*-LAMP a partir de una cantidad inicial de 100pg de ADN del parásito, realizando diluciones seriadas hasta obtener una cantidad de 0,0001pg de ADN de *T. vivax*. Los resultados obtenidos en este experimento fueron comparados con un ensayo paralelo de amplificación con la prueba de PCRT. *vivax* (González, 2011, resultados no publicados) y se muestran en la Figura 21.

Como se puede observar la reacción LAMP para la detección de *T. vivax* logró detectar hasta 0,01pg/μL de ADN del parásito (equivalente a 1trip/mL de sangre) (Figura 21, Gel A, carril 5), mientras que con la prueba de PCR solo logró obtener un límite de detección de 0,1 pg/μL de ADN (equivalente a 10 trip/mL de sangre) (Figura 21, Gel B, carril 4). Evidenciándose una sensibilidad 10 veces mayor de la prueba *Tv*-LAMP sobre el ensayo PCR al detectar el ADN de *T. vivax*.

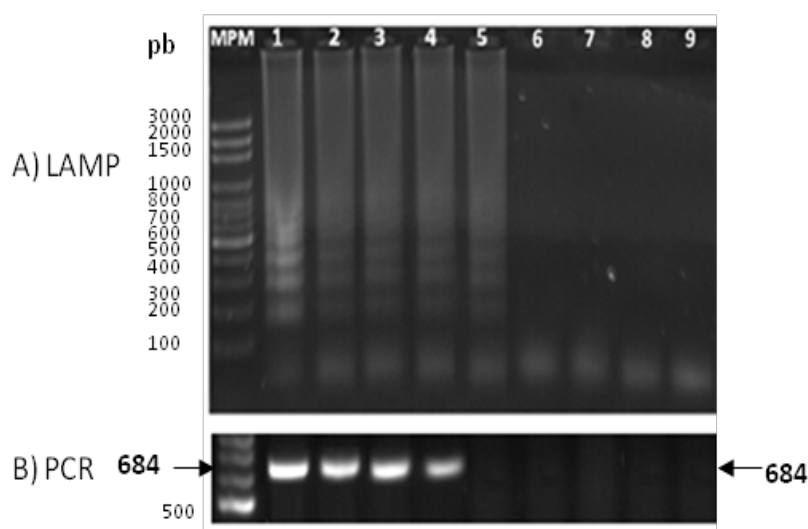


Figura 21. Comparación de la sensibilidad de detección de *Tv*-LAMP y PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 y el ensayo PCR empleando los cebadores *Tv*RcCp F/R en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles. Carril 1:100 pg/μL de ADN de *T. vivax*; Carril 2: 10pg/μL de ADN de *T. vivax*; Carril 3: 1pg de ADN de *T. vivax*; Carril 4: 0,1pg de ADN de *T. vivax*; Carril 5: 0,01pg de ADN de *T. vivax*; Carril 6: 0,001pg de ADN de *T. vivax*; Carril 7: 0,0001pg de ADN de *T. vivax*; Carril 8: ADN ovino sano; Carril 9: H₂O; MPM: 100pb.

5.3.8. Especificidad de la reacción *Tv*-LAMP.

La especificidad de los cebadores utilizados y por tanto, la de la reacción *Tv*LAMP, se determinó empleando muestras de ADN de diferentes tripanosomatídeos, así como de *L. donovani*, incluyendo ADN proveniente de un ovino sano y de ratón, con ensayos *Tv*-LAMP. Se observó el patrón de bandas característico del producto LAMP únicamente para

el ADN proveniente del ovino infectado con *T. vivax* (Figura 22, carril 1). No se observó reacción cruzada con el templado proveniente de otras especies de parásitos o vertebrados (Figura 22, carriles del 2 al 6), lo que demuestra alta especificidad de los cebadores diseñados en este estudio contra el ADN blanco.

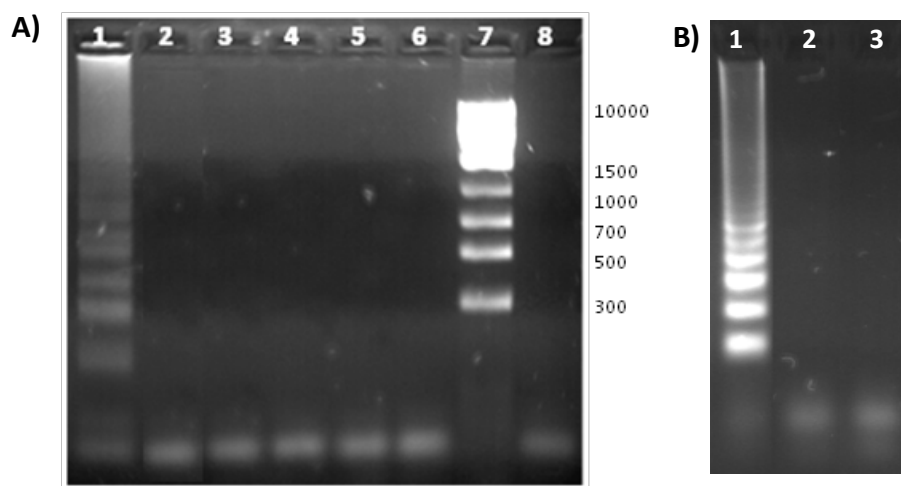


Figura 22. Especificidad de los cebadores de la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*-LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg²⁺, 100µM de dNTPs, 1M de Betaina). Gel A: Carril 1: ADN ovino infectado con *T. vivax*; Carril 2: ADN ovino sano; Carril 3: 60ng ADN *T. cruzi*; Carril 4: 60ng ADN *T. congolense*; Carril 5: 60ng ADN *L. donovani*; Carril 6: 60ng ADN ratón; Carril 7: MPM 1Kb; Carril 8: H₂O. Gel B: Carril 1: ADN ovino infectado con *T. vivax*; Carril 2: ADN ovino sano; Carril 3: 60ng ADN *T. evansi*.

5.3.9. Robustez de la técnica *Tv*-LAMP.

La robustez del ensayo *Tv*-LAMP fue determinada en este estudio evaluando diferentes tratamientos de la sangre de ovino infectada con *T. vivax*, tal y como se describió en la sección 4.5 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23. Sólo se obtuvo amplificación de la secuencia blanco únicamente en el ADN extraído de sangre infectada con *T. vivax* y ADN extraído de la capa blanca de sangre infectada, así como directamente de la capa blanca y en la sangre tratada con el

buffer de lisis. Sin embargo, no se observó amplificación empleando directamente la sangre completa del ovino infectado (Figura 23, carril 3).

5.3.10. Problemas de contaminación por amplicones presentados en la reacción *Tv*-LAMP.

Durante los ensayos de estandarización de la reacción *Tv*-LAMP se presentó una serie de problemas de contaminación que afectaron considerablemente el término del estudio. La presencia permanente de falsos positivos en los diferentes ensayos representaron verdaderos inconvenientes a la hora de validar los resultados obtenidos. Se ha reportado que los amplicones son los principales elementos causantes de la contaminación en los ensayos de amplificación (Mifflin, 2003), por esta razón se introdujo una variación de la técnica que consistió en la adición de 10 μ l de aceite mineral a cada tubo de reacción antes de la amplificación con la finalidad de eliminar o detener el escape de amplicones del tubo de reacción (Figura 25).

Los resultados obtenidos con el uso de aceite mineral se muestran en la Figura 24. Como se puede apreciar, en los tubos donde se agregó la alícuota de aceite mineral no presentaron problemas de contaminación por amplicones (Figura 24, carriles 3 y 5), observándose amplificación únicamente en la muestra positiva (Figura 24, carril 1), mientras que en aquellos tubos donde no se agregó la alícuota del aceite mineral presentaron contaminación observándose amplificación en la muestra de agua y de ADN de ovino sano (Figura 24, carriles 2 y 4).

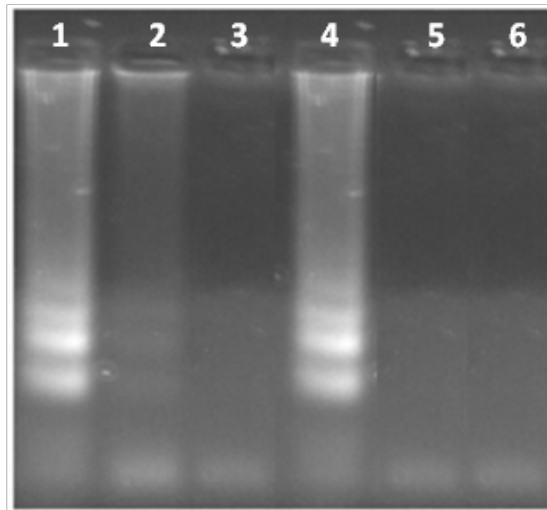


Figura 23 Robustez de la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*-LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg⁺², 100µM de dNTPs, 1M de Betaina). Carril 1: ADN extraído de un ovino infectado con *T. vivax*; Carril 2: ADN extraído de la capa blanca de sangre de un ovino infectado con *T. vivax*; Carril 3: Sangre de un ovino infectado con *T. vivax*; Carril 4: Capa blanca obtenida de sangre de un ovino infectado con *T. vivax*; Carril 5: ADN ovino sano; Carril 6: H₂O

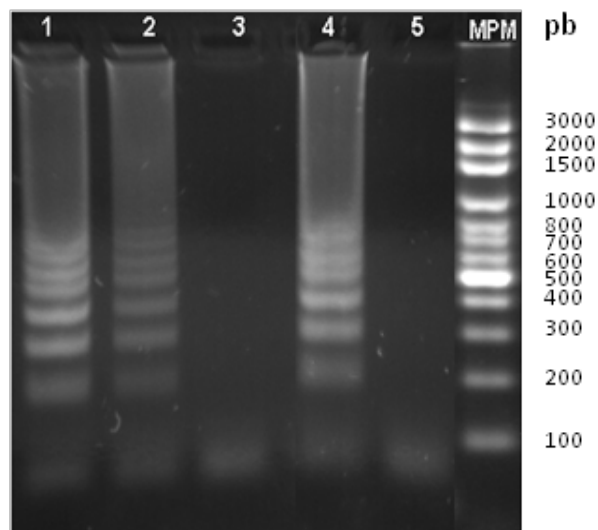


Figura 24. Evaluación del problema de contaminación de la reacción *Tv*-LAMP. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe, mostrando los productos de amplificación del ensayo *Tv*-LAMP empleando los cebadores FIP/BIP y F3/B3 en muestras de ADN provenientes de un ovino infectado (OI) con *T. vivax* y muestras controles (1Hora, 65°C, 4mM de Mg⁺², 100µM de dNTPs, 1M de Betaina). Carril 1: ADN ovino infectado con *T. vivax*- con aceite mineral; Carril 2: H₂O- sin aceite mineral; Carril 3: H₂O- con aceite mineral; Carril 4: ADN ovino sano- sin aceite mineral; Carril 5: ADN ovino sano- con aceite mineral; MPM: 100pb.

6. DISCUSIÓN

La Tripanosomosis causada por *T. vivax* afecta un número considerable de distintas poblaciones de bovinos, ovinos y caprinos y representa una problemática importante en Venezuela. Desquesnes (2004) señaló una tasa de mortalidad ganadera por *T. vivax* de 40%, con implicaciones relevantes debido a las pérdidas por mortalidad, abortos, infertilidad y costos altos por tratamientos, control y diagnóstico (García y col., 2002). Existen diferentes métodos de diagnóstico desarrollados utilizados para detectar este patógeno en los animales infectados, en los que se encuentran las técnicas parasitológicas basadas en la microscopía de luz como la gota fresca y la metodología de Woo o MHC, las técnicas serológicas como el ELISA, IFI y Hemaglutinación y finalmente, las técnicas moleculares como la PCR. Si bien es cierto que la PCR ha sido de gran utilidad en la ejecución de pruebas diagnósticas de diversas especies por su alta sensibilidad, la aplicación de esta técnica en el campo es limitada debido al empleo de equipos costosos e infraestructura. Así mismo, las pruebas parasitológicas son poco sensibles en la fase crónica de la enfermedad debido a la baja concentración de parásitos en sangre (Rivera, 1996). Por el contrario, las técnicas serológicas son altamente sensibles, sin embargo, no son capaces de diferenciar entre una infección pasiva de una activa, y además de presentar reacción cruzada con otras especies de tripanosomatideos (Luckins y col., 1977; Masake y col., 1997).

LAMP es una alternativa innovadora como método de diagnóstico específico de patógenos infecciosos como *T. vivax*, puesto que presenta ciertas ventajas competitivas sobre los métodos convencionales mencionados anteriormente. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue desarrollar un ensayo LAMP para la detección de *T. vivax* ya que apuntó ser una técnica más sensible y específica, además de ser aplicable en campo por el

empleo de un simple bloque de calentamiento o baño de agua caliente, además de ser rentadora en cuanto al balance de costos y sencillez.

En cuanto al seguimiento de la infección experimental del ovino infectado con *T. vivax*, el período de incubación del parásito en el hospedador o período de prepatencia fue de tres días (Tabla 3), aproximándose con lo señalado en infecciones con aislados venezolanos de *T. vivax* en bovinos, ovinos y caprinos (Sandoval, 1995; Mavare, 1996; Pellín y col., 2003). Así mismo, Gómez (2011) determinó que el período de prepatencia para el aislado Apure de *T. vivax* es alrededor de 2 a 3 días post-infección.

En cuanto a los valores de hematocrito, se observó una disminución de estos niveles, lo que coincide con reportes previos (Hoare, C., 1972; Losos, G. 1986; Sandoval y col., 1995). Esta disminución es una evidencia del carácter anemizante de la enfermedad (Desquesnes, 2004)

En relación a las variables temperatura corporal y parasitemia se observó una estrecha relación entre el primer aumento de la temperatura corporal y la presencia de los parásitos en sangre (Tabla 3), dicha relación ha sido anteriormente señalada en estudios sobre tripanosomosis experimental en ovinos y caprinos ocasionada por el *T. vivax* (Mavare, 1996; Sandoval, 1995; Losos, 1986; Sandoval y col., 1995). Así mismo, el ovino infectado mostró un pico de parasitemia de $5,6 \times 10^6$ trip/mL a los 13 días post-infección con el aislado de *T. vivax* empleado (Tabla 3), lo cual se aproxima a reportes realizados por Pellín y col. (2003) en un estudio de comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *T. vivax*. Se ha reportado que la patogenicidad varía dependiendo del aislado parasitario y de

la resistencia del hospedador. Así mismo, la virulencia parece ser una propiedad estable de cada aislado, ya que la enfermedad presenta rasgos agudos de corta duración en algunas regiones, mientras que en otras, sigue un curso crónico (Hoare 1972; Losos, 1986).

Al comparar las técnicas parasitológicas empleadas se pudo constatar que Woo presentó mayor sensibilidad que la técnica de gota fresca detectando el parásito al tercer día post-infección (Tabla 3). Se ha reportado que Woo es más sensible que la técnica de gota fresca (Woo, 1969; Desquesnes 2004), lo que coincide con el estudio realizado en esta investigación. En el caso de infecciones con *T. vivax*, la sensibilidad de Woo es de un 100% cuando la parasitemia es mayor que 700 trip/mL de sangre (Desquesnes, 2004). Sin embargo, la sensibilidad disminuye en un 50% cuando las parasitemias de los animales infectados oscila entre 60 y 300 trip/mL de sangre (Woo, 1969; Desquesnes, 2004). Así mismo, es difícil detectar el parásito en sangre con la MHC si la parasitemia es menor que 60trip/mL (Woo, 1969; Desquesnes 2004). Por el contrario, la gota fresca presenta una sensibilidad de 100% cuando las parasitemias oscilan alrededor de 10^3 trip/mL (Fernández y col., 2007), lo que dificulta el diagnóstico parasitológico de animales infectados con este patógeno y más aún cuando se encuentran en estado crónico.

Una vez realizado el estudio del seguimiento parasitológico del ovino infectado, se procedió con el desarrollo de la técnica LAMP para el diagnóstico de *T. vivax* (*Tv*-LAMP) en las muestras de sangre obtenidas a lo largo del proceso infeccioso. Se inició con la elección de las secuencia blanco, la cual es de vital importancia en el éxito de la reacción, por tanto requiere de ciertas características primordiales como estar dirigidas a genes específicos y altamente conservados entre especies o grupos de patógenos y con alta estabilidad.

Los cebadores empleados fueron diseñados basados en la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* de aislados venezolanos (Figura 10, Tabla 4) ya que se ha empleado como blanco específico mediante la PCR para la detección de *T. vivax* en ovinos infectados, siendo un marcador específico y de igual o mayor sensibilidad que otros marcadores (González y col., resultados no publicados). Además, presenta características distintivas en la secuencia nucleotídica de los distintos tripanosomatideos de aislados venezolanos. A pesar de que esta secuencia presenta únicamente 18 copias en el genoma de *T. vivax* (Dato obtenido de GeneDB), los resultados del presente estudio demostraron que la técnica LAMP fue capaz de detectar este parásito en ovinos infectados experimentalmente (Figura 14). Estos resultados sugieren que un mayor número de copias de la secuencia blanco no necesariamente garantiza mayor sensibilidad de la prueba, lo que coincide con reportes de González y col., (2006) quienes demuestran que a pesar de que la secuencia ITS presenta de 100 a 200 copias en el genoma de *T. vivax*, los cebadores específicos para esta secuencia presentaron menor sensibilidad que otros cebadores.

La estandarización de la técnica consistió en la variación de las cantidades de algunos de los componentes de la mezcla de reacción tomando en cuenta un rango de concentración previamente reportado para ensayos LAMP de diferentes tripanosomatideos (Tabla 1), así mismo, se varió la concentración de ADN y la temperatura de la reacción. Las condiciones óptimas para la detección específica de *T. vivax* determinadas en este estudio se muestran en la Tabla 5.

La temperatura óptima determinada en este estudio fue de 65°C, ya que a temperaturas inferiores a ésta se obtuvieron resultados falsos positivos (Figura 14). Si bien

es cierto que esta técnica es altamente sensible y que existe alto riesgo de contaminación de los productos de reacción (Figura 24), no se puede descartar el hecho que posiblemente a las temperaturas de 61 y 63 °C se este favoreciendo la amplificación de blancos inespecíficos en el caso de las muestras de sangre de ovino sano, mientras que a temperaturas mayores (65 °C) se favorece sólo la amplificación de la secuencia de interés. Los problemas de inespecificidad de cebadores coincide con la literatura (Luque J. y Herráez A., 2001). Sin embargo, se requieren posteriores estudios con digestión enzimática de los productos para asegurar que las amplificaciones a estas temperaturas son productos de contaminación o de apareamientos inespecíficos de los cebadores.

Por otra parte, la presencia de 50µM de dNTPs en la mezcla de reacción no permite la amplificación de la secuencia blanco (Figura 15). No obstante, concentraciones de 100 y 200µM de dNTPs amplifican eficientemente el templado (Figura 15), lo que coincide con reportes de Njiru y col., (2008a, 2008b).

La presencia de betaína en la reacción LAMP aumenta la eficiencia de amplificación por desestabilización química de las hélices de ADN (Notomi y col., 2000). La concentración de betaína óptima determinada fue de 1M. Sin embargo, concentraciones de 0.8 a 1,6M de betaína utilizadas en este estudio proporcionaron buenos resultados de amplificación de la secuencia blanco (Figura 16). Así mismo, Notomi y col., (2000) reportaron que concentraciones de betaína de 0.5 a 1.5M reducen el apilamiento o superenrollamiento de ADN, aumenta la tasa de eficiencia de la reacción e incrementa la selectividad de la secuencia blanco con una disminución de amplificación de secuencias irrelevantes. Por otra parte, la ausencia de betaína en la mezcla de reacción no permite la amplificación de esta secuencia (resultados no mostrados), esto se debe a la ausencia de la

química desestabilizante de la betaína lo que disminuye la apertura de la doble hélice de ADN impidiendo la actividad autodesplazante de la *Bst* polimerasa (Notomi y col., 2000).

Al variar la concentración de ADN en la mezcla de reacción resultó que una concentración de 300ng de ADN genómico inhibe la amplificación de la secuencia blanco (Figura 16). Por el contrario, concentraciones de 100 y 200ng permiten la amplificación de la secuencia blanco (Figura 17). Estos resultados coinciden con otros reportes, donde concentraciones superiores a 200ng/ μ L mostraron un efecto inhibitorio en la reacción (Njiru y col., 2008a; Thekisoe y col., 2009).

Por otra parte, la comparación de los métodos de detección del producto en este estudio incluyó la electroforesis en geles de agarosa dando la apariencia de un marcador de peso molecular en las reacciones positivas (Figura 18), la adición de SYBR Green (Figura 19) y la formación del pirofosfato de magnesio (Figura 20). La gran cantidad de ADN formado en la reacción permitió la detección visual de los productos mediante la adición de colorantes fluorescentes como el SYBR Green (Mori y col., 2001; Poon y col., 2006). La combinación de SYBR Green con los productos formados en la reacción LAMP (ADN doble hélice) inicia un cambio de color de naranja a verde (Njiru y col., 2008a; Tomita y col., 2008). Este cambio de color en la reacción es un método rápido y elimina la necesidad de utilizar bromuro de etidio para la coloración de geles de agarosa, el cual es potencialmente mutagénico (Párida y col., 2008). Sin embargo, ésta metodología al requerir la apertura de los tubos para la adición del colorante aumenta el riesgo de contaminación del producto (Nijiru y col., 2008a).

La formación de precipitado de pirofosfato de magnesio en la reacción permite la visualización del producto LAMP sin requerir la apertura de los tubos (Mori y col., 2001), por lo que disminuye el riesgo de contaminación por amplicones. En la polimerización del ADN por la *Bst* polimerasa se libera el ión pirofosfato, el cual interactúa con los iones de magnesio contenidos en la mezcla de reacción y forman el precipitado de pirofosfato de magnesio. Si el precipitado es producido, la turbidez incrementa en correlación lineal con el ADN sintetizado (Mori y col., 2001; Mori y col., 2004).

De los métodos de detección del producto *Tv*- LAMP utilizados en este estudio, la reacción colorimétrica mediante la adición de SYBR Green mostró mejores resultados disminuyendo el riesgo de contaminación a diferencia de la electroforesis en gel de agarosa. No obstante, la detección mediante la formación del precipitado de pirofosfato de magnesio no presenta riesgo de contaminación (Mori y col., 2001; Mori y col. 2004; Wastling y col. 2010). Sin embargo, este método es subjetivo al momento de observar los resultados ya que depende de la experiencia del operador (Wastling y col., 2010).

La técnica *Tv*-LAMP estandarizada en este estudio mostró tener una sensibilidad mayor que los resultados obtenidos por PCR (empleando la misma secuencia), logrando detectar hasta 0,01pg/ μ L de ADN del parásito equivalente a 1trip/mL, a diferencia de la PCR que fue capaz de detectar hasta 0,1pg/ μ L de ADN del parásito (equivalente a 10trip/mL) (Figura 21). Esta sensibilidad coincide con la reportada por Nijiru y col., (2011) empleando la secuencias repetitivas de ADN satelital en la detección de *T. vivax*. El resultado obtenido representa un buen límite de detección debido a las bajas parasitemias de este hemoflagelado en el hospedador durante la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, según Njiru y col., (2008), esta sensibilidad en condiciones de laboratorio no

necesariamente puede ser reproducible en condiciones de campo, es por ello que posteriores evaluaciones de la técnica LAMP en el campo puede ser el siguiente paso.

Así mismo, LAMP mostró ser específica con la secuencia de la RcCp de *T. vivax* (Figura 22). A pesar de que el análisis bioinformático (BLAST) mostraba que ciertos cebadores se anclaban a secuencias de tripanosomatídeos (anexo 2), al momento de realizar el ensayo de especificidad en este estudio se obtuvo únicamente amplificación de la secuencia blanco para *T. vivax*. El empleo de cuatro cebadores anclado a los blancos aumenta la especificidad de la reacción LAMP (Notomi y col., 2000).

La robustez de la reacción LAMP se caracteriza por la habilidad para amplificar ADN blanco en diferentes condiciones de muestras sin un proceso previo de purificación (Njiru y col., 2008a; Njiru y col., 2011b). De acuerdo a los resultados obtenidos mostrados en la Figura 23, se puede decir que la técnica LAMP estandarizada en este estudio mostró ser robusta empleando la capa blanca obtenida de un ovino infectado con *T. vivax*, lo que coincide con reportes de Njiru y col., (2008a) quienes demostraron que la técnica LAMP fue capaz de amplificar ADN blanco empleando 1 μ L de la capa blanca de sangre infectada con *T. brucei rhodesiense* en 25 μ L de reacción sin observar efectos inhibitorios. La capacidad de la reacción LAMP para amplificar ADN de *T. vivax* a partir de la capa blanca de sangre infectada con este parásito sin comprometer la sensibilidad de la reacción, elimina la necesidad de utilizar protocolos costosos de extracción de ADN y disminuye aún más el tiempo de procesamiento de muestras de ovinos en estudio. No obstante, en sangre completa la reacción LAMP no fue efectiva en la amplificación de *T. vivax* (Figura 23), lo cual se asemeja a resultados obtenidos por Kaneko y col. (2007) quienes demostraron que el grupo Hemo presente en la sangre actúa como un potente inhibidor de

la PCR y el LAMP. Resultados similares fueron obtenidos por Akane y col. (1994) en la amplificación mediante PCR. Esto además coincide con resultados obtenidos por Thekiso y col., (2008), quienes al utilizar 1µL de sangre fresca infectada con *T. brucei* no obtuvieron buenos resultados. Estos autores suponen que no es fácil debilitar los puentes de hidrógeno de la doble hélice de ADN cuando se emplea sangre cruda. Por otra parte, Deguo y col., (2008) reportaron resultados similares donde no observaron amplificación cuando el ADN templado no estaba puro o la fase de extracción había sido omitida, sugiriendo como lo reportado por Kaneko y col., (2007) que un amplio rango de inhibidores incluyendo sustancias orgánicas e inorgánicas, tales como detergentes, sales, proteínas y grasas pueden inhibir tanto la reacción LAMP como la PCR. A pesar de lo antes mencionado, posteriores estudios son requeridos para la estandarización de la técnica LAMP en sangre completa que podría ser útil para la detección de *T. vivax* en condiciones de campo.

Un punto importante que hay que tomar en cuenta a la hora de realizar pruebas diagnósticas son los problemas de contaminación en los procesos de amplificación de ácidos nucleicos, ya que pueden arrojar resultados falsos positivos y dar un diagnóstico erróneo del animal que se está evaluando. En este estudio en particular se presentaron ciertos inconvenientes con respecto a la contaminación en la amplificación de la RcCp de *T. vivax* empleando la técnica LAMP, obteniéndose resultados equívocos en controles negativos como agua y ADN de ovino sano (Figura 24). Mediante un estudio con digestión enzimática del producto obtenido se determinó que la contaminación era el mismo producto de amplificación del ADN de *T. vivax* (Resultados no mostrados), lo que permite deducir que los amplicones son los principales contaminantes en los análisis post-amplificación de los productos obtenidos por LAMP (Njiru y col. 2010). A pesar de que

esta técnica es altamente sensible y específica por el empleo de cuatro pares de cebadores que reconocen seis secuencias en el ADN blanco, presenta alto riesgo de contaminación por amplicones cuando los análisis post-amplificación requieren de la apertura del tubo (Notomi y col., 2000; Njiru y col., 2008a). Así mismo, Mifflin y col. (2003) reportaron que la fuente más importante de contaminación de los productos obtenidos por PCR es la generación de amplicones aerosoles que se asocian con los análisis post-amplificación. Así mismo reportó que la contaminación por amplicones depende de la frecuencia de amplificación de un blanco específico y de la cantidad y concentración de los amplicones creados por los ensayos de PCR. En LAMP funciona de igual forma, debido a que el método es capaz de sintetizar de 10 a 20 μ g de ADN específico por cada 25 μ L de reacción en un tiempo de 30 a 60min (Mori y col., 2001). Es por ello, que al realizar los análisis post-amplificación en electroforesis de geles de agarosa, aumenta el riesgo de contaminación debido a que gran cantidad de amplicones son liberados al abrir los tubos de reacción como se puede observar en la Figura 25A (Goto y col., 2009).

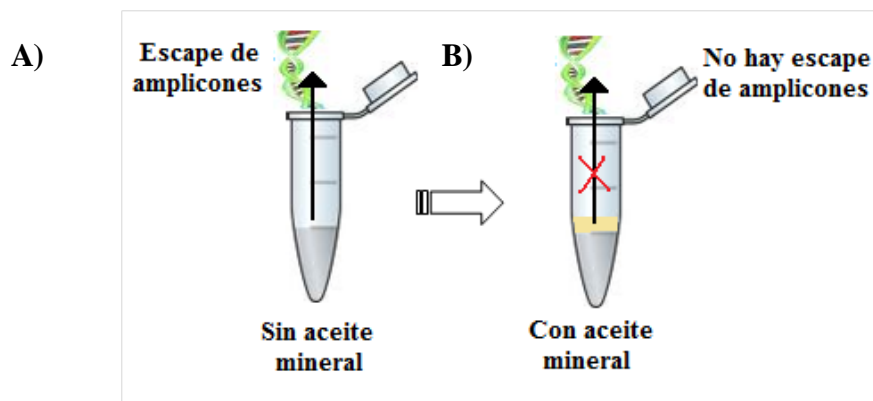


Figura 25. Efecto del aceite mineral en la mezcla de reacción LAMP. La figura muestra la funcionalidad del aceite mineral al evitar el escape de los amplicones generados en la reacción LAMP (B). Al momento de abrir el tubo los amplicones no pueden escapar puesto que el aceite mineral actúa como una barrera aislante entre la mezcla de reacción y el medio externo.

Debido a la gran cantidad de resultados falsos positivos obtenidos en este estudio se propuso emplear el aceite mineral como barrera aislante entre la mezcla de reacción y el medio externo, de forma tal de poder evitar el escape e incorporación de amplicones en los análisis post-amplificación (Figura 25 A y B). Como se puede observar en la Figura 24, en las muestras de controles negativos (Agua y ADN de ovino sano) se observó amplificación en ausencia de la alícuota de aceite mineral a diferencia de los resultados obtenidos en presencia de aceite mineral, indicando que el método propuesto en este estudio funciona como aislante de contaminación por amplicones en las muestras de controles negativos. Es importante destacar que este método no había sido propuesto antes por ningún autor.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en esta investigación representan un aporte tecnológico para el avance de la ciencia en Venezuela ya que hasta la fecha no se ha implementado una reacción LAMP para la detección específica de *T. vivax* empleando la secuencia de la RcCp. Estudios a futuros requieren la validación de la prueba en cuanto a reproducibilidad, aumentando el número de muestras estudiadas, así como, la elaboración de la técnica en condiciones de infecciones naturales con *T. vivax* donde los animales se encuentran por lo general en estado crónico de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

1. Durante la infección del ovino se observaron dos fases: la fase de prepatencia y la fase aguda de la enfermedad con un comportamiento en cuanto a duración, nivel de parasitemia, cambios en temperatura y hematocrito acordes con los patrones descritos para la infección con *T. vivax*.
2. Durante la fase aguda, la técnica de Woo resultó más sensible en la detección de *T. vivax* en ovinos infectados experimentalmente en comparación con el método de la gota fresca.
3. La secuencia de la región catalítica de la cisteína proteasa de *T. vivax* resultó ser un excelente blanco para el diseño de los cebadores de la prueba de amplificación isotérmica *Tv*-LAMP.
 - Los juegos de cebadores escogidos lograron detectar la presencia del parásito en la sangre del animal infectado con una sensibilidad de 1 trip/mL, diez veces mayor que la reacción PCR basada en la misma secuencia blanco.
 - La prueba *Tv*-LAMP desarrollada en este estudio, fue específica para *T. vivax* al evaluarla frente a ADN genómico de *T. evansi*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *Leishmania donovani*, ADN de ratón y de ovino sano.
4. La prueba *Tv*-LAMP fue robusta logrando amplificar ADN de *T. vivax* directamente a partir de la capa blanca de sangre infectada, así como en sangre completa tratada con buffer de lisis, simplificando el tratamiento de la muestra y disminuyendo el tiempo de procesamiento.

5. La prueba *Tv*-LAMP demostró ser una técnica altamente sensible y en consecuencia, de fácil contaminación por los amplicones generados en el proceso de amplificación de ADN. En este sentido la inclusión de una capa de aceite mineral en el proceso de amplificación, funciona como barrera aislante de contaminación de los productos LAMP durante los análisis post-amplificación.

6. La técnica *Tv*-LAMP puede ser considerada una herramienta valiosa por su alta especificidad, sensibilidad y bajo costo para una posterior aplicación en la detección de *T. vivax* en animales infectados experimentalmente.

8. RECOMENDACIONES

Para estudios a futuros con respecto a la técnica LAMP aplicada a la detección de *T. vivax* se recomienda:

- 1- Realizar trabajos que permitan la validación de la prueba en condiciones de campo y la reproducibilidad de la misma, para que pueda ser empleada como método de diagnóstico de tripanosomosis por *T. vivax* en Venezuela.
- 2- El empleo de equipos, materiales y reactivos con alto nivel de esterilidad, así como, la separación de áreas de procesamiento de muestras, preparación de la mezcla de reacción y análisis post-amplificación de la reacción.
- 3- Detección de los productos LAMP empleando métodos que no requieran de la apertura de los tubos de reacción para evitar el riesgo de contaminación.
- 4- El uso de los cebadores aceleradores de reacción para disminuir el tiempo de reacción de forma tal de obtener un diagnóstico preciso en corto tiempo.
- 5- Incrementar los estudios sobre análisis de *Tv*-LAMP en sangre completa infectada con *T. vivax*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* **39**:362–372.
2. Almeida, P., Ndao, M., Van Meirvenne, N., Geerts, S. 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Tropica* **66**: 45–50.
3. Anosa, V.; 1988. Haematological and biochemical changes in human and animal Trypanosomiasis. *Med. Vet. Trop.* **1**: 65-78.
4. Borst, P., Fase, F., Weijers, P., Barry, J., Laurence, T.; Vickerman, K. 1985. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol. Bio. Par.* **15**:129-142.
5. Brener, Z. 1979. O parasito: Relações hospedeiro-parasito. In Z Brener, Z Andrade, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1-41.
6. Canelón, J. y Meléndez, R. 2003. Posible origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. *Vet. Tropical.* **28(2)**: 155-167.
7. Dávila, A., Ramirez, C., Silva, R., 1997. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 357–358.
8. Dávila, A. y Silva, R. 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann. N. y Acad. Sci.* **916**:199-212.
9. Desquesnes M. y Tresse L. (1996). – Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la detection de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **49**, 315-321.
10. Desquesnes, M. y Dávila, A., 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* **109**: 213–231.

11. Desquesnes, M. y Lamine, M. 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet. Parasitol.* **119**:9–19.
12. Desquesnes, M. 2004. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. World organization for animal health. 174pp.
13. Dia, M. 1997. Epidémiologie de la trypanosomose cameline à *Trypanosoma evansi* en Mauritanie. *Thèse pour le Doctorat de parasitologie*, Université de Montpellier I, Montpellier, p. 156.
14. Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Perrone, T. 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Parasitol.* **121**: 1-7.
15. Gómez, E. 2011. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela
16. González, N., Espinoza, E., Rangel, L. 1996. Efecto del *Trypanosoma vivax* sobre la gestación de vacas mestizas Holstein-Cebu inoculadas experimentalmente. *Vet. Parasitol.* **21**(2): 111-127.
17. García, F., Suárez, C., Daza, E., Simoes, D., Rivera, M. 2002. Brotes causados por *Trypanosoma vivax* en rebaños de caprinos y ovinos del estado Falcón, Venezuela. Tesis doctoral. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
18. García, H., Rangel, A., Contreras, I., García, M., García, F., Perrone, T. 2009. Caracterización molecular de *trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, Estado Apure, Venezuela. *Rev. Cient.* **3**:230 – 237.
19. Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP. 1988. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. *U. S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook.* **651**: 70-71.

20. Gómez, E. 2011. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
21. González, N., Espinoza, E., Sandoval, E., 1999. Evaluación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta mediante el uso de antígenos de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. *Vet. Trop.* 24(2): 121-129.
22. González, L., García, J., Núñez, C., Perrone, T., González-Baradat B., Gonzatti M., Reyna-Bello, A. 2005 *Trypanosoma vivax*: a novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Exp Parasitol.* 111(2):126-9.
23. Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., 2009. Colorimetric detection of loop mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Short Tec. Rep.* 46(3): 167-172
24. Hoare, C.; 1972. The Trypanosomes of Mammals. The Salivaria. Blackwell Scientific publication, Oxford. p. 401-429.
25. Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., Flegel, T. 2008. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Vir. Met.* 153: 214-217.
26. Kubes, V. 1944. El *Trypanosoma vivax* Americano. Agente de la tripanosomiasis bovina en Venezuela. Su comparación con el del Africa. Instituto de Investigaciones Veterinarias. Editorial Grafolit. Caracas. 127pp.
27. Kuboki, N.; Inoue, N.; Sakurai, T.; Di Cello, F.; Grab, D.; Suzuki, H.; Sugimoto, C. and Igarashi, I. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Mic.* 41(12):5517-24.

28. Levine, N., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* **27**:37-58.
29. Losos, G. 1986. Infectious tropical diseases of domestic animals. Longman. Canadá. Pp.182-318.
30. Luckins, A. 1977. Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Trop. Ani. Health and Production* **9**: 53–62.
31. Masake, R.; Majiwa, P.; Molloo, S.; Makau, J.; Njuguna, J.; Maina, M.; Kabata, J.; Ole-Moiyoi, O.; and Nantulya, V., 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experim. Parasitol.* **85**: 193–205.
32. Masiga, D., Smyth, A., Hayes, P., Bromidge, T., Gibson, W., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Par.* **22**: 909–918.
33. Matovu, E., Kuepfer, I., Boobo, A., Kibona, S., Burri, C. 2010. Comparative Detection of Trypanosomal DNA by Loop Mediated Isothermal Amplification and PCR from FTA Cards Spotted with Patient Blood. *J. Cli. Microbiol.* **48(6)**:2087-90.
34. Mavare, M., García, F., Espinoza, E. 1996. Efecto de la infección experimental de *Trypanosoma vivax* sobre los parámetros clínicos y hematológicos en cabras. *Acta Cientif.* **47 (1)**: 220.
35. Mifflin, T. 2003. Setting up a PCR laboratory. Pags. 5-14 en: Dieffenbach, C., Dveksler, G., PCR Primer: A laboratory manual. Cold spring harbor, Segunda edición, New York.
36. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:150–154.

37. Mori, Y., Kitao, M., Norihiro, T., Notomi, T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* **59**:145–157.
38. Mori, Y., Kitao, M., Norihiro, T., Notomi, T. 2006. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.* **6**:3.
39. Morlais, I., Grebaut, P., Bodo, J., Djoha, S., Cuny, G., Herder, S. 1998. Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. *Acta Tropica*.**70**: 109–117.
40. Morris, J., Drew, M., Klingbeil, M., Motyka, S., Saxowsky, T., Wang, Z., Englund, P. 2001. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int. J. Parasitol* **31**. 453-458.
41. Murray, M., Murray, P., Mcintyre, W. 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**, 325–326.
42. Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Prob.* **16**: 223–229.
43. Nantulya, V. 1990. Trypanosomiasis in domestic animals: The problems of diagnosis. *Revue d'E'levage et de Medicine Veterinaire des Pays Tropicaux* **9**:357–367.
44. Njiru, Z., Constantine, C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J., Thompson, R. 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res.* **95**: 186–192.
45. Njiru, Z., Stanislaw, A., Mikosza, J., Armstrong, T., Enyaru, J. 2008a. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Plos neglected tropical diseases.* **2**: 147.
46. Njiru, Z., Mikosza, A., Matovu, E., Enyaru, J., Ouma, J., Kibona, S., Thompson, R., Ndung'u, J. 2008b. African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-

genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int. J. Par.* **38**: 589-599.

47. Njiru, Z., Ouma, J., Enyaru, J., Dargantes, A. 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. *Experim. Parasitol.* **125**: 196-201.

48. Njiru, Z., Traub, R., Ouma, J., Enyaru, J., Matovu, E. 2011a. Detection of group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* **49(4)**:1530-6.

49. Njiru, Z. 2011b. Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69(2)**:205-9.

50. Njiru, Z., Ouma, J., Bateta, R., Njeru, K., Ndungu, K., Gitonga, P., Guya, S., Traub, R. 2011c. Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. *Vet. Parasitol.* Doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.021.

51. 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)**: E63.

52. Osório, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., Gonçalves, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103(1)**: 1-13.

53. Párida, M., Sannarangaiah, S., Kumar, P., Rao, P., Morita, K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* **18(6)**:407-21.

54. Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, P., Pérez-Morga, D. 2006. The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:477-486.
55. Piñeres, E., Tavares-Marques, L., Reyna-Bello, A. 2009. Tiempo de supervivencia *In vivo* y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Científica.* **XIX(3)**: 225-229.
56. Poon, L.L., Wong, B.W., Ma, E.H., Chan, K.H., Chow, L.M., Abeyewickreme, W., Tangpukdee, N., Yuen, K.Y., Guan, Y., Looareesuwan, S., Peiris, J.S., 2006. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinic. Chem.* **52**, 303–306.
57. Radostitis, O., Gay, C., Blood, D., Hinchcliff, K. 2004. Veterinary medicine. 9^{na} edición. W. B. Saunders company Ltd. Edinburgh. 1877pp.
58. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovina. Caracas. Universidad Central de Venezuela. 243 p.
59. Sandoval, E., Espinosa, E., Valle, A. 1995. Variaciones hematológicas en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Rev. Científica.* **5**: 147-159.
60. Sandoval, E., Espinoza, E., Valle, A. 1996. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet. Tropical.* **21(1)**: 13-33.
61. Shaw, J., Lainson, R. 1972. *Trypanosoma vivax* in Brasil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **66(1)**:25-32.
62. Stefano, H., González, B., Boada, A., Avellaneda, A., Godoy, S., Soto, H. 1999. Efecto de la infección con *Trypanosoma vivax* sobre la calidad espermática de toros Siboney. *Rev. Científica.* **9(5)**: 411-417.
63. Suárez, C., González, F., Baldizán, G., Mujica, F. 2003. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Vet. Tropical.* **28(1)**: 79-92.2003.

64. Suárez, C., García, F., Baldizán, G., Valle, A. 2000. Evaluación de Parámetros de la coagulación sanguínea en Ovinos Infectados Experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. **41(1-3)**: 41-42.
65. Tafur, M., Amanda, C., Casas, A., Serrano, E. 2002. Prevalencia de tripanosoma vivax en bovinos de selva alta en la provincia de Chachapoyas, Amazonas. *Rev. Inv. Vet.* **13 (2)**: 94-97.
66. Tamasaukas, R., Roa, N., Cobo, M. 2006. Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalis bubalis*), en dos fincas del Estado Guárico, Venezuela. *Rev. Científica*. **16(6)**: 575 – 578.
67. Tamasaukas, R., Roa, N., Aso, P., Ruiz, H., Aguirre, A., Soler, L., Ordóñez, R. 1998. Diagnóstico por QBC e IFI de *Trypanosoma vivax* en ovinos estabulados en un rebaño cerrado del estado Aragua, Venezuela. 1998. Simposium Nacional Hemoparásitos y sus Vectores. Memorias. 1 y 2 de Octubre de. Maracay – Venezuela. pp 66.
68. Tani H., Teramura T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T., Noda, N., 2007. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* **79(15)**: 5608-13.
69. Thekisoe, O., Inoue, N., Kuboki, N., Tuntasuvan, D., Bunnoy, W., Borisutsuwan, S., Igarashi, I., Sugimoto, C. 2005. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol.* **130**: 327-330.
70. Thekisoe, O., Kuboki, N., Nambota, A., Kozo, F., Sugimoto, C., Igarashi, I., Yasuda, J., Inoue, N. 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. *Acta Tropical.* **102 (3)**.182-189.

71. Thekiso, O., Bazie, R., Coronel, A., Sugimoto C. 2009. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reagents and its Amplification Efficiency on Crude Trypanosome DNA Templates. *J. Vet. Med. Sci.* **71(4)**: 471–475.
72. Thekiso O., Rodríguez, C., Rivas, F., Coronel, A., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S., Inoue, N. 2010. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from *Rhodnius pallescens* Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Ame. J. Trop. Med. Hyg.* **82(5)**:855-60.
73. Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi., T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and visual detection of products. 2008. *Nat. Protoc.* **3(5)**:877-82.
74. Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. In: Hemoparásitos. Biología y Diagnóstico. Giardina, S. y García, F. (Eds) Caracas: Universidad Simón Bolívar. 33 - 51 pp.
75. Toro, M., Arenas, E., López, R., García, J., Ruiz, A. 1981. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet. Tropical.* **5**: 43-50.
76. Woo, P. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* **47**: 921-923.
77. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.htm>. [Consulta: 27 de julio de 2010].

10. ANEXOS

Anexo 1

Temperatura promedio normal de un ovino con su punto crítico

Tabla 6. Promedio de temperatura normal con su punto crítico en ovinos.

Especie	Rango normal	Punto crítico
Ovino	39.0°C (102,0 °F)	40.0°C (104,0 °F)

Radostitits y col., (2004)

Anexo 2

BLAST de los cebadores diseñados para LAMP

CEBADOR EXTERNO F3

Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
Trypanosoma theileri isolate Tab7VR clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tab7VR clone 4 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc8 clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc8 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc10 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc10 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc9 clone 4 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc9 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc2 clone 4 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate Tthc16 clone 4 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma theileri isolate TthATCC clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 39 cathepsin L-like protein-like gene, partial sequence	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 21 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 9 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 35 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 12 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 14 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 12 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%

Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 11 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>36.2</u>	36.2	100%	0.92	100%
Stigmatella aurantiaca DW4/3-1, complete genome	<u>34.2</u>	139	100%	3.6	100%
Halorhabdus utahensis DSM 12940, complete genome	<u>34.2</u>	34.2	94%	3.6	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 15 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>34.2</u>	34.2	94%	3.6	100%
Trypanosoma cruzi strain CL Brener hypothetical protein partial mRNA	<u>30.2</u>	30.2	83%	57	100%

CEBADOR EXTERNO B3

Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
Trypanosoma vi vax isolate SaMz08ca cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz07ca cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 39 cathepsin L-like protein-like gene, partial sequence	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 21 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 15 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 9 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 35 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 12 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 14 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 11 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%

Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Thalassiosira pseudonana CCMP1335 predicted protein, mRNA	<u>32.2</u>	32.2	100%	14	100%
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 36	<u>30.2</u>	233	100%	57	100%
Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 15	<u>30.2</u>	30.2	93%	57	100%
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 33	<u>30.2</u>	82.8	93%	57	100%
Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 15	<u>30.2</u>	30.2	93%	57	100%
Acidobacterium sp. MP5ACTX9, complete genome	<u>30.2</u>	109	100%	57	100%
Alicyclophilus denitrificans BC, complete genome	<u>30.2</u>	248	93%	57	100%
PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca spectrin, beta, non-erythrocytic 5 (SPTBN5), mRNA	<u>30.2</u>	30.2	93%	57	100%
Ralstonia solanacearum str. CFBP2957 chromosome, complete genome	<u>30.2</u>	82.8	100%	57	100%
Geobacillus sp. C56-T3, complete genome	<u>30.2</u>	30.2	93%	57	100%
Streptomyces bingchenggensis BCW-1, complete genome	<u>30.2</u>	268	100%	57	100%
PREDICTED: Taeniopygia guttata tripartite motif-containing 37 (LOC100225193), mRNA	<u>30.2</u>	30.2	93%	57	100%
Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1, complete genome	<u>30.2</u>	379	100%	57	100%

CEBADOR INTERNO FIP

Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 11 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Enterobacter sp. 638, complete genome	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Puccinia graminis f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein, mRNA	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Acidiphilium multivorum AIU301 plasmid pACMV3 DNA, complete sequence	<u>30.2</u>	30.2	95%	56	94%
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 29	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 23	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 23	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Halogeometricum borinquense DSM 11551, complete genome	<u>30.2</u>	56.5	85%	56	100%
Loa loa hypothetical protein (LOAG_01779) mRNA, complete cds	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Marine bacterium HP15, complete genome	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
TPA: TPA_reasm: Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome IV	<u>30.2</u>	56.5	75%	56	100%
Burkholderia phymatum STM815 chromosome 1, complete sequence	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Leishmania major hypothetical protein, conserved (LmjF23.0120) partial mRNA	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Thermotoga lettingae TMO, complete genome	<u>30.2</u>	30.2	75%	56	100%
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 16	<u>28.2</u>	28.2	90%	223	94%
Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 23	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 18	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 27	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 23	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Uncultured Amphinema clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>28.2</u>	28.2	90%	223	94%

Dickeya dadantii 3937, complete genome	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
PREDICTED: Saccoglossus kowalevskii four-jointed box (Fjx1), mRNA	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Spirosoma linguale DSM 74, complete genome	<u>28.2</u>	54.5	70%	223	100%
Saccoglossus kowalevskii four-jointed box mRNA, partial cds	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Pseudomonas sp. 365 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%
Pseudomonas sp. 4-66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>28.2</u>	28.2	70%	223	100%

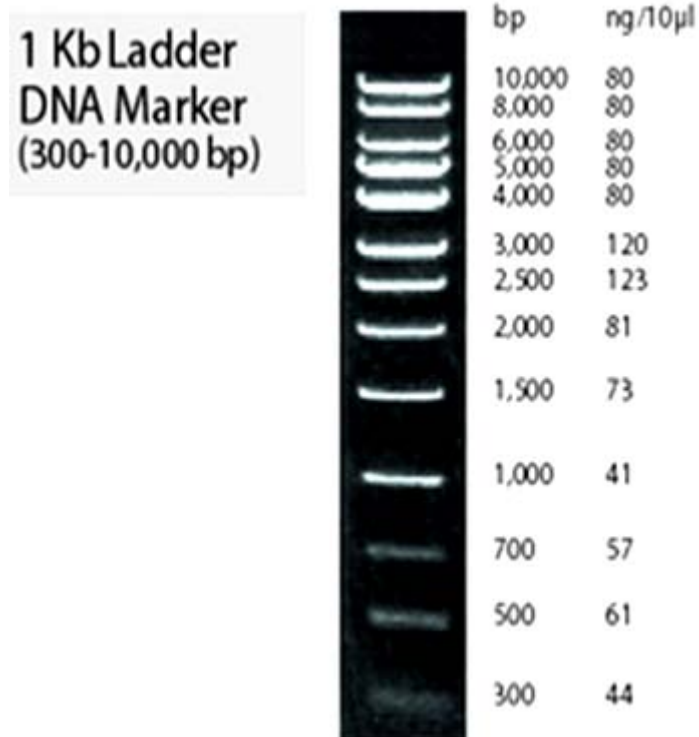
CEBADOR INTERNO BIP

Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
Trypanosoma vi vax isolate SaMz08ca cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz07ca cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 39 cathepsin L-like protein-like gene, partial sequence	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 21 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 15 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviMzNy clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 9 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate CBbo12 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 35 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate SaMz61 clone 12 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 14 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 12 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL3905 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 6 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 5 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TVmenegue clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 11 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate IL2160 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate Y486 clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviVeMe clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrMi clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Trypanosoma vi vax isolate TviBrCa clone 1 cathepsin L-like protein gene, partial cds	<u>40.1</u>	40.1	100%	0.059	100%
Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3, complete genome	<u>36.2</u>	145	100%	0.92	100%
Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0018E01 mRNA, complete cds	<u>36.2</u>	36.2	90%	0.92	100%
Arthrobacter chlorophenolicus A6, complete genome	<u>36.2</u>	88.7	90%	0.92	100%
Aspergillus terreus NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_07470) partial mRNA	<u>36.2</u>	36.2	90%	0.92	100%
Stigmatella aurantiaca DW4/3-1, complete genome	<u>34.2</u>	415	100%	3.6	100%
PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca myosin-Ig-like (LOC100479750), mRNA	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Coprinopsis cinerea okayama7#130 ### Cullin-4B, mRNA	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Coprinopsis cinerea okayama7#130 ### hypothetical protein, mRNA	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Ralstonia solanacearum str. CFBP2957 chromosome, complete genome	<u>32.2</u>	112	100%	14	100%
Streptomyces bingchengensis BCW-1, complete genome	<u>32.2</u>	353	95%	14	100%
Meiothermus silvanus DSM 9946 plasmid pMESIL01, complete sequence	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Vibrio phage VP58.5, complete genome	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Cupriavidus metallidurans CH34 megaplasmid, complete sequence	<u>32.2</u>	141	100%	14	100%

Xanthomonas albilineans str. GPE PC73, chromosome, complete genome	<u>32.2</u>	167	85%	14	100%
Streptomyces scabiei 87.22 complete genome	<u>32.2</u>	385	100%	14	100%
Geobacter sp. M21, complete genome	<u>32.2</u>	231	100%	14	100%
Ralstonia solanacearum strain MoIK2 Genome Draft	<u>32.2</u>	60.5	100%	14	100%
PREDICTED: Equus caballus similar to UBX domain containing 1 (LOC100146236), mRNA	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Methylobacterium radiotolerans JCM 2831, complete genome	<u>32.2</u>	385	100%	14	100%
Mycobacterium abscessus chromosome, complete sequence	<u>32.2</u>	84.7	90%	14	100%
Methylobacterium sp. 4-46, complete genome	<u>32.2</u>	225	100%	14	100%
Physcomitrella patens subsp. patens predicted protein (PHYPADRAFT_94651) mRNA, complete cds	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%
Shewanella halifaxensis HAW-EB4, complete genome	<u>32.2</u>	58.5	90%	14	100%
Rattus norvegicus UBX domain protein 6 (Ubxn6), mRNA	<u>32.2</u>	32.2	80%	14	100%

Anexo 2

Marcador de peso molecular 1Kb



Anexo 3

Marcador de peso molecular 100pb Ladder

