

TÉCNICA LAMP PARA LA DETECCIÓN DE *AMPHIMERUS* SP.: UN ESTUDIO EN ZONAS URBANAS DE ECUADOR

LAMP for the detection of Amphimerus sp.: a study in urban areas of Ecuador

Nuria JIMÉNEZ CARABALLO¹ 

Estephany TAPIA-VELOZ² 

Mónica GOZALBO MONFORT³ 

Pedro FERNÁNDEZ-SOTO^{1*} 

¹ Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO (Enfermedades Infecciosas y Tropicales). IBSAL-CIETUS. Área de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca. España

² Área de Parasitología. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología. Universitat de València. Valencia. España

³ Departamento de Medicina y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Universitat de València. Valencia. España

* Correo-e: pfsoto@usal.es

RESUMEN: La amphimeriosis es una enfermedad zoonótica emergente en Ecuador causada por el trematodo hepático *Amphimerus* sp. Históricamente, esta infección se ha considerado endémica de la provincia de Esmeraldas. La baja sensibilidad de las técnicas de diagnóstico convencional, como la microscopía, dificulta la identificación de nuevos focos de infección en otras regiones. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del parásito en zonas urbanas de la región central de Ecuador mediante la técnica molecular LAMPhimerus, un método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos rápido y altamente específico. Para ello, se analizaron 25 muestras de heces de población infantil procedentes de los cantones de Bucay y Penipe. Los resultados revelaron la presencia de ADN de *Amphimerus* sp. en 6 de las muestras analizadas: 5 procedentes de Bucay y 1 de Penipe. Este hallazgo

constituye la primera evidencia molecular del parásito en zonas urbanas del centro de Ecuador, lo que demuestra que su distribución geográfica puede ser más amplia de lo descrito previamente. Es necesario ampliar la vigilancia epidemiológica para determinar la prevalencia real de la enfermedad y establecer estrategias de control en las nuevas áreas identificadas.

Palabras clave: *Amphimerus* sp.; amphimeriosis; LAMP; Bucay; Penipe; diagnóstico molecular.

ABSTRACT: Amphimeriosis is an emerging zoonotic disease in Ecuador caused by the liver fluke *Amphimerus* sp. Historically, this infection has been considered endemic to the province of Esmeraldas. The low sensitivity of conventional diagnostic techniques, such as microscopy, makes it difficult to identify new foci of infection in other regions. The aim of this study was to assess the presence of the parasite in urban areas of central Ecuador using the LAMP *Amphimerus* molecular technique, a rapid and highly specific isothermal nucleic acid amplification method. To this end, 25 faecal samples from children in the cantons of Bucay and Penipe were analysed. The results revealed the presence of *Amphimerus* sp. DNA in 6 of the samples analysed: 5 from Bucay and 1 from Penipe. This finding constitutes the first molecular evidence of the parasite in urban areas of central Ecuador, demonstrating that its geographical distribution may be wider than previously described. It is necessary to expand epidemiological surveillance to determine the actual prevalence of the disease and establish control strategies in the newly identified areas.

Keywords: *Amphimerus* sp.; amphimeriosis; LAMP; Bucay; Penipe; molecular diagnostic.

1. INTRODUCCIÓN

La amphimeriosis es una enfermedad parasitaria zoonótica de origen alimentario causada por trematodos del género *Amphimerus*. La primera evidencia del parásito *Amphimerus* sp. se registra en Ecuador a mediados del siglo XX, describiéndose como un trematodo que afectaba a reptiles, aves y mamíferos (Calvopiña et al., 2011; Calvopiña et al., 2015). Las primeras infecciones en humanos se evidenciaron en zonas selváticas de la provincia de Esmeraldas (noroeste de Ecuador), en las poblaciones de los Chachis y los Montubios. En 2011, esta provincia se declaró endémica para la amphimeriosis (Calvopiña et al., 2011). Actualmente, se

sospecha de su presencia en otras zonas geográficas del centro de Ecuador, pero la escasez de estudios específicos y la limitada aplicación de técnicas diagnósticas sensibles dificultan la confirmación de nuevos focos de infección.

La infección se produce al consumir pescado crudo o poco cocinado que contenga metacercarias infectantes (Calvopiña et al., 2015). En el ciclo de vida de *Amphimerus* sp. interviene un primer hospedador intermediario (caracol), un segundo hospedador intermediario (varias especies de peces ciprínidos) y un hospedador definitivo (perros, gatos y el hombre). El ser humano actúa como un hospedador definitivo accidental del parásito, desarrollando la amphimeriosis.

La amphimeriosis afecta al hígado y a las vías biliares (Cevallos Trujillo, 2018). La mayoría de los pacientes cursan con infección asintomática, y cuando hay manifestaciones, estas suelen ser leves, incluyendo dolor abdominal, flatulencias o astenia (Cevallos Trujillo, 2018). En casos graves de infección (con elevada carga parasitaria), esta puede derivar en colangitis supurativa, coleditiasis y colangiocarcinoma (Calvopiña et al., 2015) (Cevallos et al., 2018). Se estima que alrededor de 24 millones de personas en el mundo están afectadas por trematodos de la familia *Opisthorchiidae* (Romero-Álvarez et al., 2020).

El tratamiento recomendado para la amphimeriosis es praziquantel (75mg/kg; 1/8h, 3 días) por vía oral, tanto para humanos como para animales. No se conoce aún con certeza si la dosis y la duración del tratamiento son las más adecuadas (Calvopiña et al., 2011).

El diagnóstico de la amphimeriosis humana y animal se realiza mediante la detección microscópica de huevos en heces (Cevallos et al., 2018), incluyendo el frotis directo, la sedimentación simple, el método de Kato-Katz o la concentración por formol-éter (Romero-Álvarez et al., 2020). La microscopía tiene escasa sensibilidad y morfológicamente los huevos pueden ser confundidos con los de otros parásitos trematodos hepáticos e intestinales. Para mejorar la sensibilidad, en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) se desarrolló un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que detecta anticuerpos IgG anti-*Amphimerus*. El método resultó sensible, pero de escasa especificidad, mostrando reacción cruzada con otros trematodos hepáticos y algunos nematodos (Cevallos et al., 2017). Para mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la amphimeriosis, se desarrolló una prueba molecular para la detección de ADN de *Amphimerus* sp. basada en la tecnología LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) o amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por bucle, denominada LAMphimerus (Cevallos Trujillo, 2018). La prueba resultó específica y con un límite de detección de 1 pg de ADN genómico del parásito.

La técnica LAMP se basa en la amplificación isotérmica de ADN o ARN por desplazamiento de cadena, en presencia de una *Bst* polimerasa (García Bernalt Diego

et al., 2021). Utiliza entre 4 y 6 *primers* que se unen a 6 u 8 regiones distintas del ADN, lo que garantiza una amplificación de elevada sensibilidad y especificidad (García Bernalt Diego et al., 2021). Una de las principales ventajas de la técnica LAMP es la visualización colorimétrica de los resultados al añadir al producto de reacción un colorante intercalante (por ejemplo, SYBR Green) (Wong et al., 2018). El mecanismo de LAMP se detalla en la Figura 1.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El conocimiento de la presencia de *Amphimerus* sp. en regiones de Ecuador es aún limitado, especialmente en las regiones de la Sierra Central, hasta la fecha consideradas no endémicas. El grupo de investigación de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS desarrolló una técnica LAMP (LAMPhimerus) (Cevallos et al., 2017) como una alternativa de diagnóstico molecular rápido y sencillo para la detección de *Amphimerus* sp. En este contexto, sería de interés aplicar la técnica LAMPhimerus para la detección del parásito en otras zonas geográficas, consideradas no endémicas, y así facilitar potencialmente una vigilancia epidemiológica más precisa.

Objetivo general. Evaluar la presencia de *Amphimerus* sp. en muestras clínicas procedentes de distintos cantones de la región central de Ecuador mediante la técnica molecular LAMPhimerus.

Objetivos específicos

1. Obtener y procesar muestras de heces de poblaciones de zonas urbanas de Ecuador.
2. Aplicar la técnica LAMPhimerus en muestras seleccionadas para la detección de ADN del parásito *Amphimerus* sp.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Muestras y zona de estudio*

Se recolectaron 372 muestras de heces de población infantil (3-11 años) en zonas urbanas de los cantones Penipe y Pallatanga (provincia de Chimborazo) y Bucay (provincia de Guayas). Las muestras fueron recogidas por el Grupo de Parasitología de la Universidad de Valencia (UV) en julio y agosto de 2020, como parte de un estudio sobre nutrición infantil y enfermedades parasitarias en poblaciones urbanas de Ecuador (Tapia-Veloz et al., 2023).

Las tres localidades se sitúan en la zona central de la Sierra ecuatoriana: Bucay y Pallatanga, al pie de la cordillera occidental de los Andes, y Penipe, sobre la

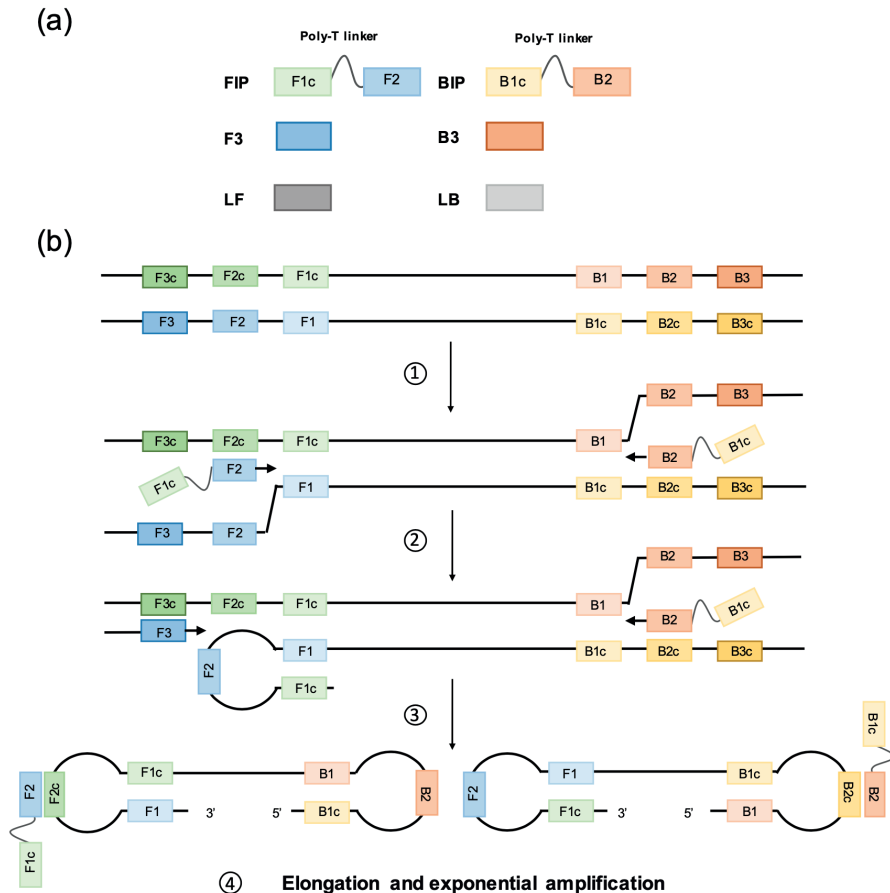


Figura 1. Mecanismo de la técnica LAMP. [a] *Primers* internos: FIP (*forward inner primer*) y BIP (*backward inner primer*). *Primers* externos: F3 (*forward outer primer*) y B3 (*backward outer primer*). *Loop primers* (opcionales): LF (*loop-forward*) y LB (*loop-backward*); reducen el tiempo de amplificación. [b1] En la fase inicial, FIP hibrida con la hebra 5'-3' del ADN y se sintetiza una cadena complementaria. [b2] F3 desplaza a la hebra sintetizada a partir de FIP, liberando un ADN monocatenario que servirá de molde para los *backward primers*. BIP hibrida con la cadena recién sintetizada y se crea una nueva hebra de ADN, que es desplazada posteriormente por B3. [b3] Se forman estructuras tallo-bucle que actuarán como inicio en una segunda fase de amplificación exponencial. [b4] En la segunda fase de elongación y amplificación exponencial se inicia la síntesis de ADN autocebado a través de los cebadores internos. (Esquema tomado de García-Bernalt Diego et al., 2021)

cordillera oriental. La procedencia de las 372 muestras recolectadas fue: 115 de Bucay, 161 de Pallatanga y 96 de Penipe.

3.2. *Procesamiento de las muestras para la obtención de ADN*

El ADN de las 372 muestras de heces se obtuvo en la UV, utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (Tapia-Veloz et al., 2023). Se enviaron al CIETUS 175 alícuotas de 20-30µL de ADN obtenido, numeradas y agrupadas por lotes de las distintas localidades. Se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para este trabajo, se seleccionaron 25 muestras: 20 de Bucay y 5 de Penipe.

3.3. *Preparación del ADN utilizado como control positivo*

Como control positivo en las reacciones LAMP se utilizó ADN de *Amphimerus* sp., almacenado a -20°C en el CIETUS. Para obtener mayor cantidad, se reamplificó con el kit Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) y se midió su concentración con un espectrofotómetro Nanodrop ND-100. Además, se adquirió una secuencia de ADN sintética comercial de *Amphimerus* sp. (GenScript, SC2930-H), que se amplificó mediante PCR para generar mayor cantidad de ADN, y poder utilizarlo como control positivo en los distintos ensayos de LAMP. A partir del amplicón se prepararon diluciones seriadas (100, 20, 10, 5 y 1 ng/mL) que fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

3.4. *Análisis molecular de las muestras mediante 'LAMPhimerus'*

Las 25 muestras seleccionadas se analizaron mediante la técnica LAMPhimerus, utilizando las condiciones de reacción y cebadores previamente diseñados en el CIETUS, descritas en Cevallos et al., 2017. LAMPhimerus amplifica una secuencia de 459 pares de bases correspondientes a una secuencia parcial de ADN genómico de la región ITS2 de *Amphimerus* sp. (Cevallos et al., 2017). Las mezclas de reacción (*master mix*), incluyendo los reactivos utilizados, se muestran en la Tabla 1. Las 25 muestras seleccionadas se analizaron en dos lotes de 10 muestras (Bucay), y un lote de 5 muestras (Penipe). Los lotes de análisis incluyeron controles positivos (ADN de *Amphimerus* sp.) y controles negativos (agua ultrapura en lugar de ADN). Todas las reacciones se realizaron a 65°C en un termobloque durante 50-60 min más una incubación a 80°C durante 10 min para inactivar la *Bst* polimerasa y finalizar la reacción.

Tabla 1. Mezclas de reacción para LAMPhimerus. Cada tubo contiene 13μL de mezcla de reacción y 2μL de ADN (control positivo o muestra) o agua ultrapura (control negativo). El manejo de volúmenes pequeños requiere un ligero exceso de volumen en la preparación.

Reactivo	ml en 1 tubo	ml en 8 tubos	ml en 15 tubos
H ₂ O	6,82	54,56	102,3
dNTPs	2,1	16,8	31,5
IB10x	1,5	12	22,5
MgSO ₄	0,9	7,2	13,5
F3	0,3	2,4	4,5
B3	0,3	2,4	4,5
FIP	0,24	1,92	3,6
BIP	0,24	1,92	3,6
<i>Bst</i> 2.0 Warm Start	0,6	4,8	9
TOTAL	13,0	91,0	182,0

3.5. Detección de los productos de amplificación

El revelado de los resultados del LAMPhimerus colorimétrico se realizó añadiendo 2μL/tubo del colorante intercalante SYBR® Green I (1:10; 10,000X; Invitrogen). Las muestras negativas (sin ADN amplificado) mantuvieron el color naranja del colorante; las muestras positivas (con amplificación de ADN) viraron a color verde por incorporación del SYBR® Green I.

4. RESULTADOS

4.1. Preparación del ADN utilizado como control positivo. Análisis molecular de las muestras mediante LAMPhimerus

El resultado de las reacciones LAMP realizadas para valorar la utilidad del ADN sintético obtenido comercialmente se puede observar en la Figura 2a. Los productos de las reacciones se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La visualización del resultado bajo luz ultravioleta mostró que la intensidad de las bandas de amplificación en los controles positivos era la misma independientemente de la concentración utilizada (Figura 2b). Por ello, se determinó 1ng/mL como concentración idónea para su uso como control positivo.

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras mediante LAMPhimerus se muestran en la Figura 2c. De las 25 muestras analizadas, 6 resultaron positivas y 19, negativas. De las 6 muestras positivas, 5 provenían de Bucay y 1 de Penipe.

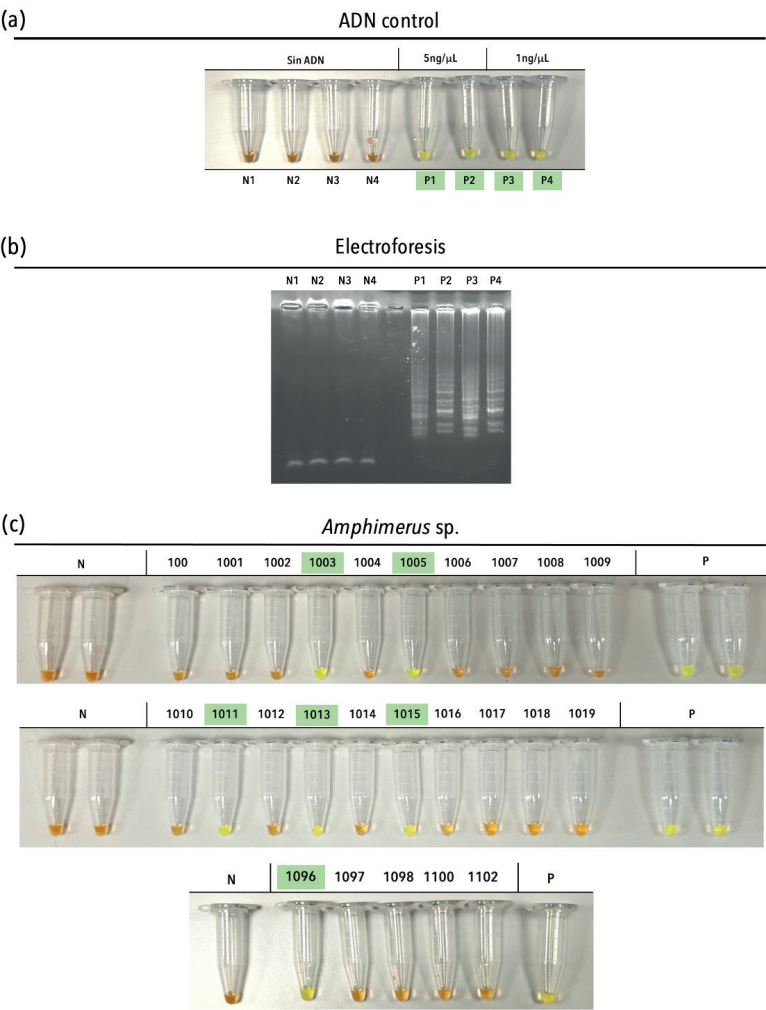


Figura 2. Resultado del análisis mediante LAMphimerus colorimétrico. [a] Amplificación de ADN sintético de *Amphimerus* sp. N1-N4 (controles negativos; no ADN); P1-P4 (controles positivos; P1-P2 con 5ng/mL de ADN; P3-P4 con 1ng/mL de ADN) y [b] electroforesis en gel de agarosa. [c] Análisis de las muestras procedentes de Ecuador; 100-1019, muestras de Bucay; 1096, 1097, 1098, 1100, 1002, muestras de Penipe. N (controles negativos); P (controles positivos; 1ng/mL de ADN). El color verde indica resultado positivo; el color naranja; resultado negativo.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en la aplicación de la técnica LAMP para la detección de ADN del parásito *Amphimerus* sp. en muestras de heces recolectadas en un estudio previo sobre nutrición infantil y enfermedades parasitarias en poblaciones urbanas de Ecuador (Tapia-Veloz et al., 2023). Este método de detección molecular se aplicó a 25 muestras procedentes de dos localidades del centro de Ecuador: Penipe y Bucay. Los resultados obtenidos mostraron la detección de ADN de *Amphimerus* sp. en 6 muestras de las analizadas. Los estudios publicados anteriormente sobre *Amphimerus* sp. en Ecuador describen una elevada prevalencia de la infección humana en la provincia selvática de Esmeraldas, con valores de infección entre el 23% (Rodríguez-Hidalgo et al., 2024) y el 36% (Romero-Álvarez et al., 2020) (Calvopiña et al., 2018). Considerando estos valores de prevalencia, era previsible que el parásito pudiera encontrarse también en otras áreas geográficas del país que aún no se habían investigado. La detección de casos positivos en Penipe y Bucay constituye la primera evidencia de la presencia de *Amphimerus* sp. en zonas urbanas del centro de Ecuador, lo que amplía su distribución geográfica conocida y refuerza la necesidad de extender la vigilancia epidemiológica a otras regiones del país.

LAMPhimerus es un método molecular sencillo que presenta elevada especificidad y sensibilidad, superando las limitaciones de la microscopía convencional, con sensibilidad reducida y cuyos resultados pueden verse comprometidos por la similitud morfológica de los huevos de *Amphimerus* sp. con otros trematodos y nematodos intestinales, dificultando enormemente el diagnóstico en zonas endémicas. En este trabajo, los controles positivos y negativos mostraron un comportamiento adecuado, lo que confirma la robustez técnica del procedimiento empleado y la fiabilidad de los resultados del análisis de las muestras.

El estudio se limita a unas pocas muestras recogidas en población infantil (3-11 años), por lo que se desconoce la presencia de *Amphimerus* sp. en otros grupos de edad (adolescentes o adultos) y no permite extrapolar valores de prevalencia real en las zonas estudiadas. No obstante, el análisis de las muestras ha permitido la primera detección molecular del parásito *Amphimerus* sp. en los cantones de Penipe y Bucay. Es conveniente pues ampliar el número de muestras a analizar e incluir muestras de diferentes grupos etarios y contextos socioculturales, con el fin de obtener estimaciones representativas de la prevalencia real de *Amphimerus* sp. en la región central de Ecuador. También resultaría de interés combinar la técnica LAMPhimerus con métodos coproparasitológicos convencionales, con el objetivo de realizar comparaciones del rendimiento diagnóstico. Por otro lado, la investigación de hospedadores intermediarios en las zonas estudiadas contribuiría a esclarecer si existe un ciclo de transmisión local establecido, favoreciendo el diseño de estrategias de control.

6. CONCLUSIÓN

Se ha detectado por primera vez ADN de *Amphimerus* sp. en muestras de heces de niños en los cantones de Bucay y Penipe (Ecuador), sugiriendo que la distribución geográfica de *Amphimerus* sp. podría ser más amplia de lo descrito previamente. No es posible establecer conclusiones epidemiológicas definitivas debido al limitado tamaño muestral analizado, pero los resultados aportan evidencias sobre la posible circulación del parásito en distintas zonas urbanas del país, y pone de manifiesto la necesidad de ampliar la vigilancia en regiones no estudiadas anteriormente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- CALVOPIÑA M, CEVALLOS W, ATHERTON R, SAUNDERS M, SMALL A, KUMAZAWA H, et al. High Prevalence of the Liver Fluke *Amphimerus* sp. in Domestic Cats and Dogs in an Area for Human Amphimeriasis in Ecuador. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(2):1-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003526>
- CALVOPIÑA M, CEVALLOS W, KUMAZAWA H, EISENBERG J. High Prevalence of Human Liver Infection by *Amphimerus* spp. Flukes, Ecuador. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2331-2334. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110373>
- CALVOPIÑA M, ROMERO-ÁLVAREZ D, DIAZ F, CEVALLOS W, SUGIYAMA H. A comparison of Kato-Katz technique to three other methods for diagnosis of *Amphimerus* spp. liver fluke infection and the prevalence of infection in Chachi Amerindians of Ecuador. PLoS One. 2018;13(10):1-11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0203811>
- CEVALLOS TRUJILLO WF. Epidemiología y diagnóstico de la amphimeriosis en Ecuador. Tesis Doctoral [Salamanca, España]: Universidad de Salamanca; 2018.
- CEVALLOS W, CALVOPIÑA M, NIPÁZ V, VICENTE-SANTIAGO B, LÓPEZ-ALBÁN J, FERNÁNDEZ-SOTO P, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Amphimerus* spp. liver fluke infection in Humans. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(5):364-369. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160426>
- CEVALLOS W, FERNÁNDEZ-SOTO P, CALVOPIÑA M, BUENDÍA-SÁNCHEZ M, LÓPEZ-ABÁN J, VICENTE B, et al. Diagnosis of amphimeriasis by LAMPhimerus assay in human stool samples long-term storage onto filter paper. PLoS One. 2018;13(2):1-11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0192637>
- CEVALLOS W, FERNÁNDEZ-SOTO P, CALVOPIÑA M, FONTECHA-CUENCA C, SUGIYAMA H, SATO M, et al. LAMPhimerus: A novel LAMP assay for detecting *Amphimerus* sp. DNA in human stool samples. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(6):1-16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005672>
- GARCÍA-BERNALT DIEGO J, FERNÁNDEZ-SOTO P, MURO A. LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. Diagnostics. 2021;11(3):1-23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11030521>

- RODRÍGUEZ-HIDALGO R, CEVALLOS W, CELI-ERAZO M, VARGAS-ROMAN V, OVIEDO-RACINES L, BUITRÓN J, et al. Amphimeriasis in Ecuador - Prevalence, Knowledge, and Socio-Cultural Practices Among Indigenous Chachi and Montubios Populations: A Mixed-Methods Cross-Sectional Study. Trop Med Infect Dis. 2024;9(10):1-19. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9100248>
- ROMERO-ÁLVAREZ D, VALVERDE-MUÑOZ G, CALVOPIÑA M, ROJAS M, CEVALLOS W, KUMAZAWA H, et al. Liver fluke infections by *Amphimerus* sp. (Digenea: *Opisthorchiidae*) in definitive and fish intermediate hosts in Manabí province, Ecuador. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(6):1-18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008286>
- TAPIA-VELOZ E, GOZALBO M, GUILLÉN M, DASHTI A, BAILO B, KÖSTER PC, et al. Prevalence and associated risk factors of intestinal parasites among schoolchildren in Ecuador, with emphasis on the molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* sp. and *Enterocytozoon bienersi*. PLoS Negl Trop Dis. 2023;17(5): 1-21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0011339>
- WONG Y-P, OTHMAN S, LAU Y-L, RADU S, CHEE H-Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J Appl Microbiol. 2018;124(3):626-643. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13647>