



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“DETECCIÓN MOLECULAR DE  
*LEISHMANIA* SPP. SUBGÉNERO  
*VIANNIA* BASADA EN EL SISTEMA  
CRISPR-CAS12A UTILIZANDO COMO  
BIOMARCADOR EL ADN DE  
MINICÍRCULOS DEL KINETOPLASTO  
(ADNK)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

EVA ANDREA DUEÑAS VILLAVICENCIO

LIMA - PERÚ

2022



**Asesora**

Vanessa Adui Sichei, Ph.D.

**Co-asesor**

Jorge Arévalo Zelada, Dr.Sc.

**JURADO DE TESIS**

DRA. CRISTINA GUERRA GIRALDEZ

PRESIDENTE

DR. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA

VOCAL

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

SECRETARIO

**Dedicatoria**

*A mis padres, por su amor incondicional*

## **Agradecimientos**

Mi agradecimiento a mi familia, por el apoyo incondicional.

A mis asesores la Dra. Vanessa Adui y el Dr. Jorge Arévalo por la confianza y las enseñanzas brindadas en el camino de la formación profesional y personal.

A los miembros del Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, al Dr. Pohl Milón por sus aportes de mejora y en especial a Jose Nakamoto y Luis Cabrera por su colaboración y contribuciones en este trabajo, así como en el diseño bioinformático de cebadores y ARN guía proporcionados.

A Percy Huaihua del Laboratorio de Pathoantígenos, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, por los aportes con el análisis de las muestras mediante el ensayo de qPCR-ADNk.

## **Fuente de financiamiento**

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto de investigación: Desarrollo de una plataforma biosensora basada en CRISPR para la detección rápida y ultrasensible de microorganismos patógenos de importancia médica: leishmaniosis como “prueba de concepto”, financiado por ProCiencia, CONCYTEC-Banco Mundial mediante convenio de subvención N° 036-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.

El manuscrito de artículo con base parcial en este trabajo está accesible a la comunidad científica como ‘*preprint*’ en bioRxiv (Dueñas *et al.*, 2022; <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.29.490093v1>) y como artículo científico publicado en la revista *Frontiers in Microbiology* sección agentes infecciosos y enfermedad (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.958693>).

# DETECCIÓN MOLECULAR DE LEISHMANIA SPP. SUBGÉNERO VIANNIA BASADA EN EL SISTEMA CRISPR-CAS12A UTILIZANDO COMO BIOMARCADOR EL ADN DE MINICÍRCULOS DEL KINETOPLASTO (ADNK)

## INFORME DE ORIGINALIDAD

15% EN

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

11%

PUBLICACIONES

10%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1 [new.esp.org](https://www.new.esp.org) Fuente de Internet 2%

2 [ouci.dntb.gov.ua](https://ouci.dntb.gov.ua) Fuente de Internet 1%

3 [link.springer.com](https://link.springer.com) Fuente de Internet 1%

4 Submitted to University of Keele Trabajo del estudiante 1%

5 [experiments.springernature.com](https://experiments.springernature.com) Fuente de Internet <1%

6 Harsimranjit Sekhon, Jeung-Hoi Ha, Stewart N. Loh. "Engineering protein and DNA tools for creating DNA-dependent protein switches", Elsevier BV, 2022  
Publicación <1%

7 Submitted to University of Wisconsin System Trabajo del estudiante

## TABLA DE CONTENIDOS

I. Introducción.....	1
II. Planteamiento del problema y justificación de la investigación.....	7
III. Marco Teórico.....	11
3.1 Leishmaniasis.....	11
3.2 Aspectos generales de la enfermedad leishmaniasis tegumentaria americana.....	14
3.3 El ADN del kinetoplasto de <i>Leishmania</i> : ADN de minicírculos.....	16
3.4 Biomarcador ADNk y diagnóstico molecular de leishmaniasis basado en la PCR.....	19
3.5 Tecnología CRISPR-Cas.....	20
3.6 Mecanismo de reconocimiento y corte por Cas12a.....	25
3.7 Actividad colateral de la enzima Cas12a en la detección molecular de agentes patógenos.....	28
3.8 Cinética enzimática de la endonucleasa Cas12a para la detección <i>in vitro</i> de ácidos nucleicos.....	31
3.9 Ventajas y limitaciones de las plataformas CRISPR/Cas.....	33
3.10 Factores que influyen en el desempeño de la reacción CRISPR-Cas12a <i>in vitro</i> .....	35
IV. Pregunta de investigación y objetivos.....	38
V. Materiales y métodos.....	40
5.1 Diseño del estudio.....	40
5.2 Consideraciones éticas.....	41
5.3 Estimación del tamaño muestral.....	42
5.4 Muestras biológicas.....	43
5.5 Diseño de ARN guía y cebadores específicos para una región conservada del ADN de minicírculos del kinetoplasto (ADNk).....	45
5.5.1 Diseño de ARN guía específico de minicírculos del ADNk.....	45

5.5.2	Diseño de cebadores.....	48
5.6	Transcripción <i>in vitro</i> para la producción de crARN-ADNk y crARN-ARNasa P y su purificación.....	48
5.7	Curva de ADN genómico de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904.....	49
5.8	Optimización de la PCR de punto final para la pre-amplificación del ácido nucleico diana (ADNk).....	52
5.8.1	Curva de temperatura de hibridación de los cebadores para el biomarcador ADNk.....	53
5.8.2	Curva de concentración de cebadores para el biomarcador ADNk	53
5.9	Optimización de la reacción CRISPR-Cas12a.....	54
5.9.1	Curva de concentración de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ).....	55
5.9.2	Evaluación de la temperatura de la reacción CRISPR-Cas12a.....	57
5.10	Evaluación de la sensibilidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk .....	57
5.11	Evaluación de la especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk.....	58
5.12	Evaluación de la prueba de detección PCR/CRISPR-ADNk en muestras clínicas.....	59
5.13	Análisis de los resultados.....	60
5.13.1	Análisis de los ensayos de optimización de la PCR de punto final dirigido al ADNk.....	60
5.13.2	Análisis de los ensayos de optimización, sensibilidad y especificidad analítica del ensayo PCR/CRISPR-ADNk.....	61
5.13.3	Análisis de las muestras clínicas.....	62
5.13.4	Análisis estadístico.....	66
VI.	Resultados.....	68
6.1	Producción del crARN-ADNk.....	68
6.2	Curva de temperatura de hibridación de los cebadores.....	68
6.3	Curva de concentración de cebadores para el ADNk.....	70
6.4	Curva de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) en la reacción CRISPR-Cas12a.....	71
6.5	Evaluación de la temperatura de reacción de la enzima Cas12a.....	75

6.6 Ensayo de sensibilidad analítica.....	77
6.7 Ensayo de especificidad analítica.....	81
6.8 Muestras clínicas.....	84
VII. Discusión.....	96
VIII. Conclusiones.....	111
IX. Limitaciones.....	112
X. Recomendaciones.....	113
XI. Referencias bibliográficas.....	114
XII. Anexos	

## Índice de figuras:

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del parásito protozoario <i>Leishmania</i> .....	13
<b>Figura 2.</b> Endemicidad global de Leishmaniasis cutánea en el 2020.....	14
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de las regiones conservadas que componen el ADN de minicírculo del kinetoplasto de <i>Leishmania</i> .....	17
<b>Figura 4.</b> Estrategias de detección molecular de patógenos basadas en los sistemas CRISPR-Cas.....	24
<b>Figura 5.</b> Composición y estructura de la enzima nucleasa Cas12a.....	26
<b>Figura 6.</b> Modelo esquemático de la unión y escisión del ADN diana guiada por el complejo FnCas12a-crARN.....	28
<b>Figura 7.</b> Flujograma del trabajo experimental.....	41
<b>Figura 8.</b> Curva de temperatura de <i>annealing</i> para el par 1 de cebadores del ADNk.....	68
<b>Figura 9.</b> Curva de concentración de cebadores.....	69
<b>Figura 10.</b> Curva de concentración de magnesio en la reacción CRISPR empleando el par 1 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación.....	71
<b>Figura 11.</b> Curva de concentración de magnesio en la reacción CRISPR empleando el par 2 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación.....	73
<b>Figura 12.</b> Curva de temperatura de la reacción CRISPR.....	75
<b>Figura 13.</b> Ensayo de sensibilidad analítica con dos pares de cebadores para el biomarcador ADNk.....	79
<b>Figura 14.</b> Evaluación de la especificidad analítica de dos pares de cebadores para el biomarcador ADNk.....	81

<b>Figura 15.</b> Ensayo de la especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk.....	83
<b>Figura 16.</b> Diferencia entre los valores de la razón de fluorescencia de los controles positivos y negativos a los 20 minutos de la reacción CRISPR-Cas12a.....	84
<b>Figura 17.</b> Mapa de calor ( <i>heatmap</i> ) de los resultados de las pruebas qPCR-ADNk (Cq) vs. PCR/CRISPR-ADNk.....	88
<b>Figura 18.</b> Los valores de la razón de fluorescencia del ensayo PCR/CRISPR-ADNk en el rango de carga parasitaria determinada por la prueba qPCR-ADNk en un panel de muestras clínicas.....	90
<b>Figura 19.</b> Resultados de los análisis del porcentaje de positividad (PP).....	92
<b>Figura 20.</b> Tipo de muestra tomada por métodos invasivos y no invasivos correspondiente a los casos positivos por qPCR-ADNk y PCR-CRISPR-ADNk.....	93

### **Índice de tablas:**

**Tabla 1.** Cuantificación de ADNg de cepas de referencia de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*

**Tabla 2.** Cuantificación y cálculo de la concentración del crARN-ADNk

**Tabla 3.** Determinación del punto de corte basado en  $\bar{X} + 3DE$  para el biomarcador ADNk

### **Índice de Anexos:**

**Anexo 1.** Preparación de soluciones stock para la reacción CRISPR

**Anexo 2.** Tabla de oligonucleótidos de los cebadores, crARN y sonda reportera utilizados en este estudio

**Anexo 3.** Mix para amplificación por PCR

**Anexo 4.** Condiciones de ciclaje de la reacción de PCR de punto final

**Anexo 5.** Parámetros de configuración en el equipo lector de fluorescencia Synergy

## Abreviaturas

ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ADNg	:	ADN genómico
ADNk	:	ADN de minicírculos del kinetoplasto
ADNr	:	ADN ribosomal
ARN	:	ácido ribonucleico
ARNasa P	:	ribonucleasa P
ARNi	:	ARN de interferencia
ARNm	:	ARN mensajero
ARNr	:	ARN ribosomal
Bucle R / <i>R-loop</i>	:	híbrido ADN-ARN en forma de bucle
<i>c</i> PCR	:	reacción en cadena de la polimerasa convencional
Cas	:	proteínas asociadas al sistema CRISPR
crARN	:	ARN guía
CRISPR	:	repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
CSB	:	bloque de secuencia conservada
dCas9	:	proteína Cas9 catalíticamente inactiva
<i>ds</i> DNA	:	ADN de doble cadena
e.g.p	:	equivalentes genómicos de parásitos

ERV-3	:	retrovirus endógeno 3
LAMP	:	amplificación isotérmica mediada en lazo
LC	:	Leishmaniasis cutánea
LM	:	Leishmaniasis mucosa
LV	:	Leishmaniasis visceral
NASBA-OC	:	amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos acoplada a oligocromatografía
PAM	:	motivo adyacente al protoespaciador
POC	:	punto de atención (del inglés, <i>point-of-care</i> )
PPA	:	porcentaje de concordancia positiva
NPA	:	porcentaje de concordancia negativa
qPCR	:	PCR cuantitativa en tiempo real
RFU	:	unidades relativas de fluorescencia
RPA	:	amplificación por recombinasa y polimerasa
RPA-LF	:	amplificación por recombinasa y polimerasa adaptada a tiras de flujo lateral
sgRNA	:	ARN guía en el sistema CRISPR-Cas9
ssDNA	:	ADN de cadena simple

## Resumen

La Leishmaniasis tegumentaria americana es una enfermedad infecciosa endémica presente en 19 departamentos del Perú. *Leishmania (Viannia) braziliensis* es el principal agente etiológico de esta enfermedad en las Américas. La presentación clínica más frecuente es la Leishmaniasis cutánea que provoca lesiones cutáneas ulceradas. La confirmación del diagnóstico presuntivo clínico se basa en la realización de más de una prueba de laboratorio, que puede ser de tipo parasitológica, inmunológica o molecular. Existen diferencias en el grado de sensibilidad y especificidad de estas pruebas, además de que requieren tiempos largos de procesamiento y tienen un costo alto. Recientemente se han desarrollado pruebas de detección molecular de agentes patógenos altamente específicas y sensibles empleando la herramienta CRISPR/Cas donde destaca el sistema CRISPR-Cas12a.

En el presente estudio se desarrolló y evaluó un método nuevo de detección molecular de *Leishmania (Viannia) spp.* basado en el sistema CRISPR-Cas12a en combinación con un paso previo de amplificación por PCR convencional empleando como biomarcador multicopia al ADN de minicírculos del kinetoplasto (ADNk). En la evaluación de la sensibilidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk el límite inferior de detección fue de 0.05 equivalentes genómicos de parásitos (4.25 fg de ADN) (n=3), lo que constituye un valor con relevancia clínica. Además, la prueba de especificidad mostró que las cepas de referencia representativas de *L.(Viannia) spp.* generaron una señal distintiva con un promedio del valor de la razón de fluorescencia (ésto es, señal fluorescente de la muestra

problema normalizada por la señal fluorescente del blanco de reacción) de  $2.287 \pm 0.29$  en comparación al valor de  $0.967 \pm 0.08$  del grupo de cepas del subgénero *L.(Leishmania)* a los 20 minutos de la reacción CRISPR (n=4). La diferencia en los valores de la razón de fluorescencia en los grupos evaluados fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ; prueba t para datos no pareados). No hubo reacción cruzada con ADN genómico humano ni con ADN de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

La prueba PCR/CRISPR-ADNk desarrollada se evaluó en un panel de 49 muestras clínicas. Utilizando como punto de corte el criterio de la 'media de los valores de la razón de fluorescencia de muestras negativas más 3 desviaciones estándar' (*cutoff* =1.151), el 79.6% (39/49) de las muestras resultaron positivas y el 20.4% (10/49) resultaron negativas a detección de ADNk de *Leishmania*. Se consideró un segundo método de clasificación basado en el porcentaje de positividad (PP) de cada muestra (en relación a un control positivo) a partir de la data de señal fluorescente de la reacción Cas12a y un análisis estadístico para seleccionar el punto de corte de probabilidad óptimo para la clasificación que maximice el índice de Youden; este análisis resultó en la misma clasificación de resultados positivos (n=39;  $PP > 29.995\%$ ) y negativos (n=10;  $PP \leq 29.995\%$ ) que el punto de corte de media + 3DE. Ambos análisis catalogaron a las muestras clínicas con concordancia perfecta comparado con PCR en tiempo real (qPCR-ADNk) empleada como prueba de referencia: se obtuvo 100.0% de concordancia positiva (IC 95%: 91.0-100.0) y 100.0% de concordancia negativa (IC 95%: 72.2-100.0). Se demostró el potencial de la prueba PCR/CRISPR-ADNk como método nuevo de detección molecular de especies de *Leishmania* (*Viannia*) de importancia médica en Latinoamérica.

**Palabras claves:** Leishmaniasis cutánea, *Leishmania (Viannia) spp.*, ADNk del minicírculo, CRISPR-Cas12a, detección molecular

## **Abstract**

American tegumentary leishmaniasis is an endemic infectious disease present in 19 departments of Peru. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiological agent of this disease in the Americas. The most common clinical presentation is cutaneous leishmaniasis, which causes ulcerated skin lesions. Confirmation of the presumptive clinical diagnosis is based on the performance of more than one laboratory test, which may be of parasitological, immunological, or molecular type. There are differences in the degree of sensitivity and specificity of these tests, in addition to the fact that they require long processing times and are expensive. Recently, highly specific and sensitive molecular detection tests for pathogens have been developed using the CRISPR/Cas tool, where the CRISPR-Cas12a system stands out.

In the present study, a new method of molecular detection of *Leishmania (Viannia)* spp. based on the CRISPR-Cas12a system in combination with conventional PCR preamplification was developed and evaluated. The method targets the multi-copy kinetoplast DNA (kDNA) minicircles. In the analytical sensitivity evaluation of the PCR/CRISPR-kDNA assay, the lower limit of detection was 0.05 parasite genome equivalents (4.25 fg of DNA) (n=3), which is a value with clinical relevance. In addition, the analytical specificity evaluation showed that the representative reference strains belonging to the *L.(Viannia)* subgenus generated a distinctive signal with an average fluorescence ratio (that is, fluorescent signal of the test sample normalized by the fluorescent signal of the no-template control) of  $2.287 \pm 0.29$  compared to the value of  $0.967 \pm 0.08$  of the

group of strains belonging to the *L.(Leishmania)* subgenus at 20-min time point of the CRISPR-Cas12a assay (n=4). The difference in fluorescence ratio values between the evaluated groups was statistically significant ( $p < 0.001$ ; t-test for unmatched data). There was no cross-reaction with human genomic DNA or *Trypanosoma cruzi* Y strain DNA.

The developed PCR/CRISPR-kDNA assay was evaluated in a panel of 49 clinical samples. Using as a cut-off point the criterion of 'mean fluorescence ratio of negative samples plus 3 standard deviations' (cutoff = 1.151), 79.6% (39/49) of the samples were positive and 20.4% (10/49) were negative for *Leishmania* DNA detection. A second classification method was considered based on the percentage of positivity (PP) of each sample (relative to a positive control) from the raw fluorescence data of the Cas12a assay and a statistical analysis to select the optimal probability cut-off point for the classification that maximizes the Youden index; this analysis resulted in the same classification of positive (n=39; PP > 29.995%) and negative (n=10; PP 29.995%) results as the mean + 3SD cutoff point. Both analyses classified the clinical samples with perfect agreement compared to a real-time PCR (qPCR-kDNA) assay used as the reference test: 100.0% positive agreement (95% CI: 91.0-100.0) and 100.0% negative agreement (95% CI: 72.2-100.0). The potential of the PCR/CRISPR-kDNA assay as a new molecular method for detection of species of *Leishmania (Viannia)* of medical importance in the Latin American region was demonstrated.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia)* spp., kDNA minicircles, CRISPR-Cas12a, molecular detection



## **I. Introducción**

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria provocada por la picadura del insecto vector hembra del género *Lutzomyia* (Familia: *Psychodidae*; Subfamilia *Phlebotominae*) que transmite los protozoos pertenecientes al género *Leishmania* en la forma infectiva promastigote al hospedero mamífero. La leishmaniasis humana es una enfermedad compleja que abarca infecciones asintomáticas y manifestaciones clínicas heterogéneas <sup>1</sup>. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se presentan cuatro formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral (o Kala-azar), leishmaniasis dérmica post-kala-azar y leishmaniasis mucosa <sup>2</sup>. La Leishmaniasis cutánea (LC) está caracterizada por lesiones cutáneas (con tendencia a la ulceración) que pueden ser únicas o múltiples. Tiene un período de incubación de 1-4 semanas y se presenta un cuadro afebril. En la leishmaniasis visceral (LV) se ven afectados los órganos internos y puede llegar a ser mortal si el paciente no recibe tratamiento antileishmanial oportuno. En el caso de la leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL), esta afección aparece después de un episodio de LV y se caracteriza por la aparición de una erupción cutánea en el rostro que puede extenderse a otras partes del cuerpo; mientras que la leishmaniasis mucosa (LM) provoca invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea <sup>3</sup>.

De acuerdo al informe más reciente de la OMS, la leishmaniasis se encuentra en 200 países de los cuales 98 son países en los que la enfermedad es endémica. Alrededor de 71 países son endémicos tanto para la LV como para la LC y 19

países, principalmente del trópico y neotrópico, son endémicos solo para la LC. En los últimos 5 años se han reportado 1 203 780 casos nuevos de LC <sup>2</sup>.

La leishmaniasis tegumentaria americana es una enfermedad endémica en Latinoamérica, desde México hasta Argentina. Comprende principalmente dos formas clínicas: LC y LM <sup>4</sup>. En Perú, es una enfermedad endémica que afecta a las regiones andinas y selváticas. En estas regiones circulan y coexisten varias especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *L.(Leishmania)* como *L.(L.) amazonensis* y al subgénero *L.(Viannia)* entre las que destacan *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) lainsoni* <sup>5</sup>.

*Leishmania (V.) braziliensis* es el principal agente etiológico de la LC en América Latina, enfermedad que puede progresar a LM <sup>6,7</sup>. Esta especie se caracteriza por grandes diferencias en biología básica en comparación con especies de *Leishmania* del Viejo Mundo (como *L.(L.) infantum*). Primero, *L.(V.) braziliensis* tiene un desarrollo peripilariano en la mosca vector debido a que también coloniza el intestino grueso, mientras que las especies del subgénero *L.(Leishmania)* tienen un desarrollo suprapilariano en el insecto vector <sup>8</sup>. Segundo, *L.(V.) braziliensis* presenta una mayor diversidad genética, ya que posee algunas peculiaridades en su genoma, como la presencia de elementos transponibles y genes que codifican la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi), ambos ausentes en especies del subgénero *L. (Leishmania)* como *L. major* y *L. infantum* <sup>9,10</sup>. Tercero, los factores de virulencia de *L. braziliensis* influyen en la inmunología de la infección y la evasión del sistema inmune en el hospedero mamífero <sup>11,12</sup>.

Se dispone de tres métodos de diagnóstico principales de leishmaniasis con variaciones en la precisión del diagnóstico. En primer lugar, tenemos a las técnicas parasitológicas convencionales (microscopía, cultivo de parásitos e histología) cuyas limitaciones radican en su baja sensibilidad y el requerimiento de experiencia técnica para llevar a cabo el procedimiento. En segundo lugar, las pruebas serológicas actuales son de uso limitado para LC y LM, debido a su baja sensibilidad (dado que en ambas formas clínicas predomina la respuesta inmune celular) y posible reactividad cruzada principalmente con *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas <sup>13</sup>. En tercer lugar, tenemos a los métodos moleculares que están limitados a centros de referencia principalmente por las áreas de trabajo, equipamiento y personal capacitado que se requiere para sus procedimientos.

El diagnóstico molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes son actualmente los más sensibles y específicos utilizados para la detección de *Leishmania*, a menudo en combinación con la tipificación molecular de la especie de *Leishmania* infectante, que puede orientar la selección del tratamiento más apropiado o el seguimiento de la eficacia del tratamiento <sup>14</sup>. Entre las dianas genéticas utilizadas para la detección de *Leishmania* se encuentran biomarcadores con número múltiple de copias de una región altamente conservada, como por ejemplo el ADN de minicírculos del kinetoplasto (que presenta hasta 10,000 minicírculos por parásito). Esto convierte a la PCR-ADNk en el método más sensible para el diagnóstico de leishmaniasis. Dependiendo de los cebadores la región amplificada permite la detección específica a nivel de género o subgénero

de *Leishmania* <sup>15</sup>. En el campo del diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas recientemente se han desarrollado plataformas de detección basadas en la tecnología CRISPR/Cas. Éstas están acopladas a un proceso de pre-amplificación de la secuencia del ácido nucleico diana empleando técnicas convencionales como PCR o la amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP) o la amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa (RPA). Este paso previo de amplificación permite enriquecer las moléculas de ácido nucleico diana e incrementa la sensibilidad de la detección. Las plataformas pioneras en esta área son el sistema SHERLOCK (por sus siglas en inglés *specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking*) <sup>16</sup>, DETECTR (por sus siglas en inglés *DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*) <sup>17</sup> y HOLMES (por sus siglas en inglés *one-HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) <sup>18</sup>. Estas técnicas utilizan los sistemas CRISPR-Cas con componentes biomoleculares sintéticos (ARN guías conocidos como crARNs, diseñados *in silico* que son complementarios al sitio diana específico) para la detección *in vitro* de una secuencia de ácido nucleico (ADN/ARN) biomarcadora del patógeno. En el caso del ensayo CRISPR-Cas, el proceso de detección inicia con la formación de un complejo binario Cas12a-crARN que reconoce una secuencia PAM en la diana. Este reconocimiento específico activa a la nucleasa Cas12a que realiza un corte en *cis* en el ADN de doble hebra (*dsDNA*). Ello desencadena el corte en *trans* indiscriminado (conocido como actividad colateral de la enzima Cas12a) de un sustrato de ADN de hebra simple (*ssDNA*) incluido como sonda reportera [contiene un fluoróforo unido

covalentemente al extremo 5' y un apagador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'] en la mezcla de reacción. Esta actividad colateral inespecífica de Cas12a produce una señal fluorescente medible por un instrumento lector de fluorescencia <sup>19</sup>. Actualmente este método se ha aplicado en la detección de agentes patógenos de importancia en salud pública, tales como el virus del papiloma humano (VPH) <sup>17</sup>, virus de ARN como dengue, Zika <sup>16</sup> y SARS-CoV-2, bacterias donde resaltan los trabajos en *Mycobacterium tuberculosis* <sup>20-22</sup> y protozoarios como *Plasmodium* spp. causantes de malaria <sup>23-24</sup> y *Toxoplasma gondii* <sup>25</sup>. En tripanosomátidos como *Leishmania* existe un reciente trabajo publicado, en donde se desarrolló un método de detección de especies causantes de la forma clínica LV basado en el sistema dCas9 <sup>26</sup>.

En el presente trabajo se desarrolló y evaluó la prueba PCR/CRISPR-ADNk para la detección de especies de *Leishmania* (*Viannia*) causantes de LC y LM en Latinoamérica. Primero, se optimizó el paso de pre-amplificación por PCR y la reacción CRISPR-Cas12a. Segundo, se evaluó la sensibilidad y especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk. Luego, se evaluó el desempeño de la prueba en un panel de 49 muestras clínicas con estatus de infección por *Leishmania* conocido. Se utilizaron dos estrategias para la determinación del punto de corte para la clasificación de los casos positivos/negativos a detección del ADN de *Leishmania*: el método de la media de muestras negativas más tres veces la desviación estándar y el análisis del porcentaje de positividad. Los resultados obtenidos se compararon con la prueba de referencia qPCR-ADNk <sup>48</sup>, validada en el Laboratorio de Patho-antígenos, LID-UPCH.

Finalmente, se demostró el potencial de aplicación de este ensayo en la detección de especies de *Leishmania* (*Viannia*) de importancia médica a nivel local y regional en Latinoamérica.

## II. Planteamiento del problema y justificación de la investigación

### *Planteamiento del problema*

La leishmaniasis tegumentaria americana es una enfermedad endémica desatendida presente en áreas rurales y suburbanas de las zonas tropicales y subtropicales del territorio peruano, donde el acceso a los servicios de salud suele ser escaso. La población susceptible a contraer la infección por *Leishmania* es comúnmente de recursos limitados y ésta es la principal barrera para el diagnóstico oportuno, tratamiento temprano y efectivo de los pacientes, monitoreo de la infección y la vigilancia epidemiológica.

La leishmaniasis cutánea y mucosa son las dos formas de esta enfermedad caracterizada por pleomorfismo y complejidad clínica. Debido a ello es importante realizar un diagnóstico diferencial respecto a otras enfermedades presentes en las áreas geográficas donde circula *Leishmania* y que generan lesiones cutáneas similares a la producida por este parásito, tales como blastomicosis sudamericana, lepra, esporotricosis, cáncer de piel o rinoscleroma. De esta manera se evita que el médico tratante prescriba un tratamiento con fármacos antileishmaniales y los posibles efectos adversos relacionados con la toxicidad de dichos fármacos en pacientes que padecen una enfermedad debida a otras etiologías <sup>27</sup>.

Numerosos estudios indican que *Leishmania (Viannia)* spp. son las especies más relevantes en nuestra región debido a su alta prevalencia <sup>5</sup>. En áreas de endemidad, la LC se diagnostica con frecuencia por evaluación clínica y antecedentes

epidemiológicos, porque la mayoría de los métodos de diagnóstico parasitológico convencional, así como moleculares están disponibles sólo en laboratorios de referencia. Las pruebas serológicas en LC no son tan útiles para el diagnóstico porque los anticuerpos tienden a presentar títulos bajos y tienen un valor limitado

28

La selección de la prueba de diagnóstico a ser empleada a menudo depende más de la infraestructura y los recursos disponibles que de la precisión del método de diagnóstico. Entre las pruebas disponibles que permiten la detección del parásito están la visualización directa (por microscopía) de amastigotes de *Leishmania* a partir del frotis de la lesión cutánea o por técnicas de cultivo celular, o técnicas moleculares como PCR. Sin embargo, debido a los requerimientos de equipos de laboratorio y personal entrenado, estas técnicas quedan restringidas a laboratorios de referencia y centros de investigación.

Es por ello que existe la necesidad de desarrollar pruebas más sencillas, asequibles y que sean capaces de detectar densidades bajas del parásito (ésto es, carga parasitaria baja) en una infección asintomática o sintomática temprana, y que podrían ser de gran utilidad en regiones endémicas.

La revolucionaria tecnología CRISPR-Cas es una herramienta novedosa diseñada para la detección altamente específica y sensible de agentes patógenos, entre muchas otras aplicaciones. En diversos estudios reportados se demostró el potencial de CRISPR-Cas para convertirse en un método nuevo de diagnóstico molecular para diversas enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y parásitos de

importancia en salud pública como los protozoarios patógenos *Plasmodium* y *Leishmania*.

Se planteó como pregunta de investigación si el sistema CRISPR-Cas12a dirigido a la diana genética multicopia ADNk será capaz de detectar a especies representativas de *Leishmania* del subgénero *L. (Viannia)* en muestras de lesiones de piel de pacientes con leishmaniasis cutánea.

### *Justificación*

Los métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos permiten la detección directa de los parásitos en muestras clínicas, evitándose la necesidad de cultivo de los parásitos. Estos métodos además proporcionan la ventaja de una mayor sensibilidad. Los métodos más comunes de amplificación reportados para la detección de especies individuales de *Leishmania* incluyen PCR convencional y cuantitativa <sup>29</sup>.

La leishmaniasis es una enfermedad desatendida en nuestra región que cuenta con pruebas de laboratorio para el diagnóstico de rutina (parasitológicos, serológicos) y otras actuales como las pruebas moleculares basadas en la PCR. Estas pruebas requieren de equipos costosos, personal técnico experto y en su mayoría están restringidas a laboratorios de referencia o de investigación centralizados. Además, hay que resaltar la importancia de disponer de pruebas diagnósticas precisas para

la confirmación de la infección por *Leishmania* en pacientes, dado que la confirmación parasitológica es un requisito obligatorio antes de iniciar una estrategia de tratamiento clínico adecuado <sup>30</sup>.

Actualmente no se encuentra disponible una prueba rápida, altamente sensible y asequible para el diagnóstico de LC en áreas endémicas. Existe la necesidad de desarrollar métodos moleculares novedosos como herramientas de diagnóstico que puedan aplicarse a zonas con recursos limitados que sólo tienen acceso a postas o centros de salud de atención primaria.

El presente estudio está enfocado en el ensayo CRISPR-Cas12a combinado con pre-amplificación del ADN diana por PCR convencional (PCR/CRISPR-ADNk), con la finalidad de proporcionar la prueba de concepto de la aplicabilidad de la tecnología CRISPR-Cas a la detección de una diana genética multicopia de *Leishmania* spp. en muestras clínicas. La PCR fue seleccionada por ser una prueba estándar de amplificación de ácidos nucleicos y ha demostrado ser el enfoque más sensible y robusto empleado en el diagnóstico molecular de leishmaniasis <sup>31</sup>. Dada la necesidad de seguir desarrollando herramientas útiles que permitan democratizar el acceso a un diagnóstico robusto y certero, la plataforma basada en CRISPR optimizada en este estudio tiene el potencial de proporcionar una prueba de detección del parásito *Leishmania* con alta especificidad y sensibilidad, adecuada para su uso en laboratorios de referencia, de investigación y hasta clínico.

### III. Marco Teórico

#### 3.1 Leishmaniasis

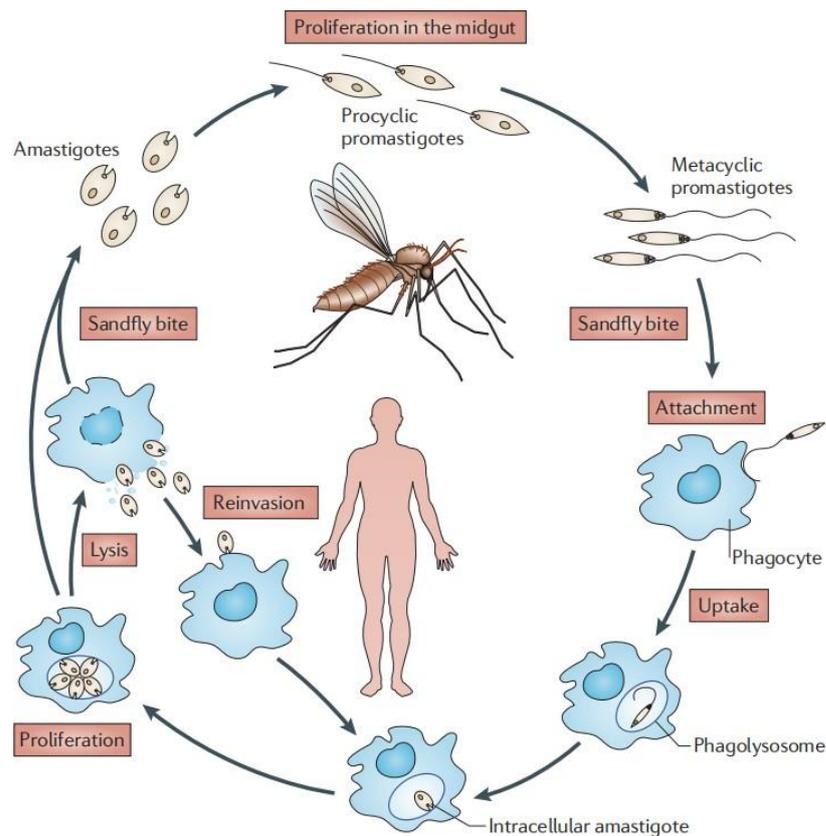
La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por protozoarios parásitos del género *Leishmania* (Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae) que se divide en dos subgéneros según su desarrollo en el intestino de los insectos vectores: *Leishmania*, en el intestino medio o anterior, y *Viannia*, en el intestino medio y posterior del insecto flebótomo. El agente vector es la mosca de arena del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. La transmisión del parásito se produce a través de la picadura de un insecto infectado al hospedero humano (ciclo antroponótico) y otros animales mamíferos (ciclo zoonótico) <sup>1</sup>.

*Leishmania* es un parásito intracelular obligado de células del linaje de macrófagos y células dendríticas en el hospedero mamífero <sup>32</sup>. *Leishmania* es un protozoo dimórfico, con una forma flagelada denominada promastigote que reside en el insecto vector y la forma de amastigote intracelular que reside en el hospedero mamífero. El ciclo de vida digenético de *Leishmania* inicia con el promastigote extracelular procíclico móvil flagelado, que se encuentra en el tracto digestivo del insecto vector flebótomo donde se duplica por división binaria. Los parásitos sufren la metaciclogénesis y se convierten en promastigotes metacíclicos que no se dividen (etapa infectiva) y luego migran a las glándulas salivales de los vectores. A través de la regurgitación, los

flebótomos hembras introducen parásitos junto con factores inmunomoduladores y otros diversos componentes salivales durante la alimentación en las áreas expuestas de la piel de los mamíferos. Los parásitos son captados por los fagocitos, como neutrófilos, células dendríticas y, especialmente, los macrófagos en el tejido dérmico de mamíferos y otros hospederos vertebrados. Dentro de los fagolisosomas de los macrófagos, los parásitos se transforman a amastigotes no flagelados, donde se produce la proliferación. Los amastigotes intracelulares se desarrollan y se multiplican por mitosis dentro del fagocito hasta que estos son liberados por lisis celular para infectar otros macrófagos<sup>33,34</sup>. En la última década se ha generado evidencia que demuestra que los amastigotes también adoptan un estado de dormancia con un metabolismo quiescente, estadio no replicativo en los hospederos mamíferos, esto ha sido relacionado a infecciones crónicas<sup>35</sup>.

El ciclo se reinicia cuando los flebótomos hembras ingieren células infectadas durante la alimentación del hospedero infectado (Figura 1).

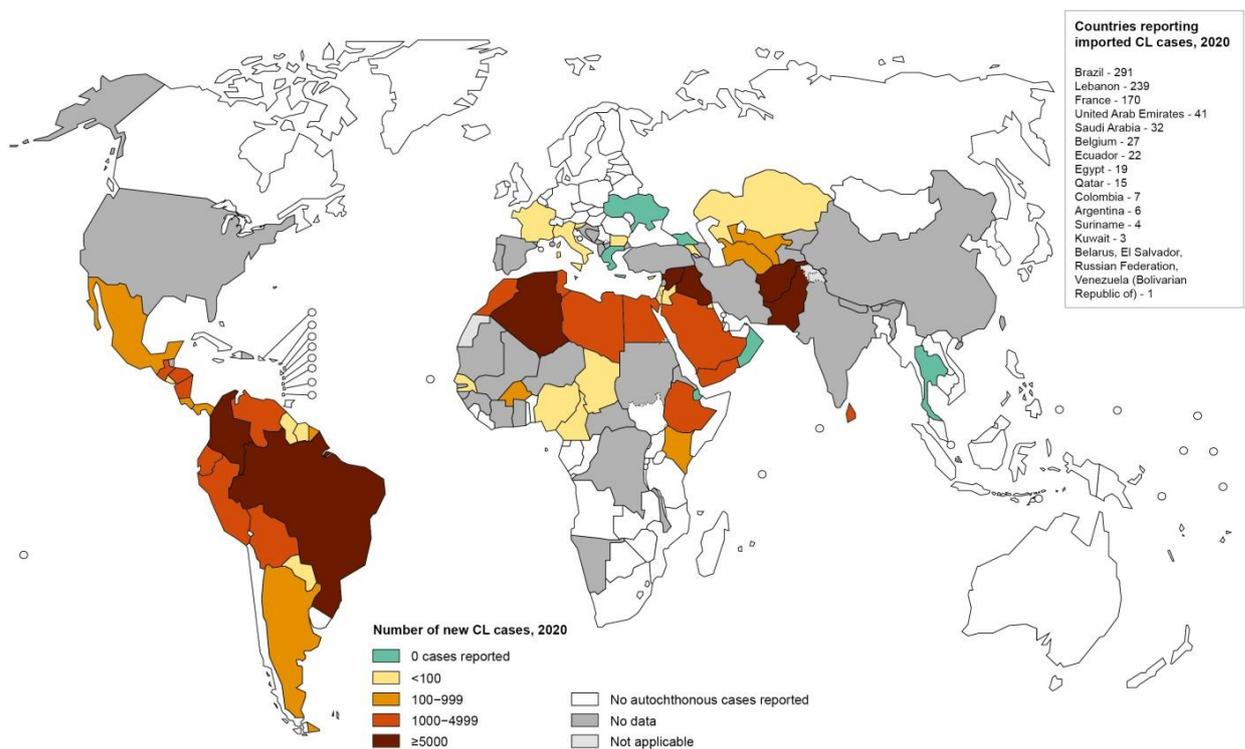
Existen 22 especies de *Leishmania* que son patógenas para el ser humano, distribuidas en las 4 regiones eco-epidemiológicas alrededor del mundo: las Américas, África Oriental, África del Norte y Asia Occidental y Sudoriental. La leishmaniasis es endémica en 98 países y afecta a cerca de 12 millones de personas. Las manifestaciones clínicas ocurren en cuatro categorías principales: leishmaniasis cutánea, visceral, mucocutánea y post-kala-azar. La forma más común y compleja de la enfermedad es la LC pero la LV es la que puede generar una condición grave y es casi siempre fatal si no se trata<sup>2,36</sup>.



**Figura 1.** Ciclo de vida del parásito protozoario *Leishmania* <sup>34</sup>.

La LC es la forma clínica más prevalente de leishmaniasis en todo el mundo y el 95% de todos los casos ocurren en solo siete países: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria (Figura 2). Se estima que hay entre 700 000 y 1 millón de casos de infección humana con aproximadamente 26 000 a 65 000 muertes notificadas anualmente LC <sup>37</sup>. En la región sudamericana, en países como Brasil, Colombia y Perú se presentaron en el año 2020 entre 1000-5000 casos nuevos.

Entre las especies del Viejo Mundo que producen LC destacan: *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, mientras que entre las especies del Nuevo Mundo que predominantemente provocan la enfermedad se encuentran *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*.



**Figura 2.** Endemicidad global de Leishmaniasis cutánea en el 2020. Fuente: World Health Organization Map production: Control of neglected tropical diseases (NTD), WHO 2021. [https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis\\_cl\\_2020.png?sfvrsn=81df4387\\_5](https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_cl_2020.png?sfvrsn=81df4387_5)

### 3.2 Aspectos generales de la enfermedad leishmaniasis tegumentaria americana

La leishmaniasis tegumentaria americana es una enfermedad crónica infecciosa no contagiosa causada por varias especies del protozooario parásito *Leishmania* en el Nuevo Mundo y transmitida al hospedero humano y otros mamíferos a través de insectos hembra de *Phlebotominae*, de las cuales la más común es *Lutzomyia* spp. La LC y LM son las manifestaciones clínicas más comunes de esta enfermedad y son el resultado de la replicación del parásito *Leishmania* en la dermis y mucosa naso-orofaríngea, respectivamente. La presentación

típica de LC se caracteriza por una o más lesiones ulcerativas localizadas en la piel de curación lenta. La LM comprende lesiones en la mucosa oral, nasal o faríngea destructivas y desfigurantes, según el estado inmunológico del paciente y la especie infectante de *Leishmania*. En la forma clínica mucocutánea, las lesiones cutáneas y mucosas se presentan de manera simultánea. La LC comprende una variedad de manifestaciones, que incluyen la forma localizada (más común) y las formas menos frecuentes LC difusa y diseminada, de difícil curación <sup>38</sup>.

En el territorio peruano el 90% de casos son de LC y tiene una distribución a nivel nacional, mientras que la LM comprende el 10% y se limita a las áreas cubiertas por el bosque lluvioso del Amazonas. Las infecciones por *Leishmania* spp. también pueden cursar en forma asintomática.

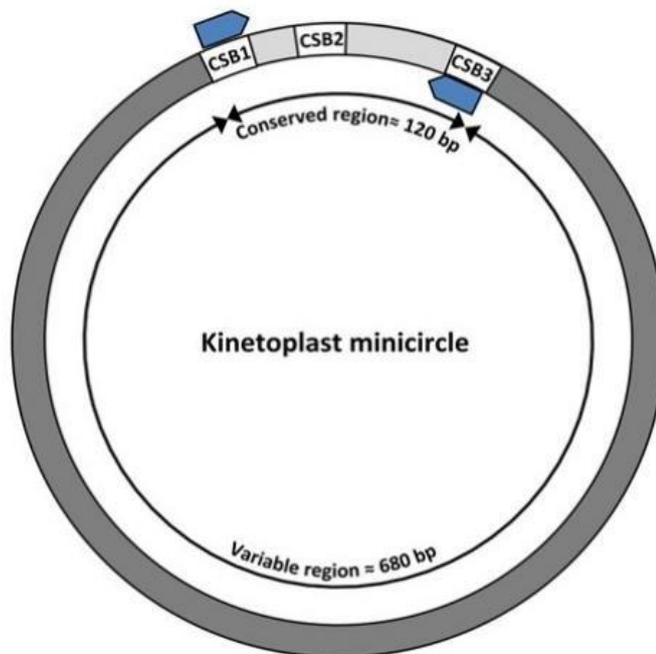
Esta enfermedad endémica y no controlada en Perú (y otros países de Latinoamérica, desde México hasta Argentina) es una de las 20 enfermedades tropicales desatendidas (NTD) clasificadas por la OMS presente principalmente en países en vías de desarrollo <sup>39</sup>. La LC está presente en 19 departamentos como Junín, Cusco, Madre de Dios, Cajamarca, Piura y San Martín donde se presenta el mayor número de casos. Las especies circulantes en las regiones andinas e interandinas como selváticas son principalmente del complejo *L. braziliensis* como *L.(V.) braziliensis* y *L.(V.) peruviana*, del complejo *L. guyanensis* y del complejo *L. mexicana* como *L.(L.) amazonensis*<sup>5</sup>. La infección por *L.(V.) braziliensis* es responsable de la mayoría de casos de leishmaniasis tegumentaria en América del Sur y se caracteriza por cronicidad,

latencia y tendencia metastásica y produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden atribuirse a la diversidad genética y fenotípica de esta especie de parásito <sup>5,38,40</sup>.

### **3.3 El ADN del kinetoplasto de *Leishmania*: ADN de minicírculos**

El parásito *Leishmania* presenta una estructura en forma de disco denominada kinetoplasto, ubicada en una porción especializada de la mitocondria dentro de la matriz mitocondrial y perpendicular al eje del flagelo. El kinetoplasto posee un largo y denso genoma mitocondrial conocido como ADN del kinetoplasto (ADNk) organizado en varios miles de moléculas circulares interconectadas en una red concatenada, una característica común a otros flagelados kinetoplastidos <sup>41</sup>. El ADNk representa entre el 10-20% del total del ADN celular donde el 95% lo constituye el ADNk de minicírculos <sup>42,43</sup>.

Existen dos tipos de moléculas circulares (ADN de cadena doble) presentes en el kinetoplasto: los maxicírculos y los minicírculos. Los maxicírculos son aquellas moléculas grandes de 20-25 Kb y que se encuentran en un número bajo de copias (<100) mientras que los minicírculos son pequeñas de 0.8 a 1 Kb y de número alto de copias (>10 000 por parásito). El número de copias de maxicírculos y minicírculos difiere hasta 6 veces entre las especies de *Leishmania*, pero las diferencias son menores entre las cepas de una misma especie.



**Figura 3.** Representación gráfica de las regiones conservadas que componen el ADN de minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania* <sup>43</sup>. Los tres bloques de secuencia conservada (CSB) se indican en recuadros blancos. Las flechas azules indican los sitios de unión de los cebadores de PCR utilizados para amplificar un fragmento de 120 pb dentro de la región conservada.

Los estadios de vida de amastigote y promastigote de *Leishmania* contienen un número similar de maxicírculos o minicírculos de ADNk. Los minicírculos del ADNk se caracterizan por heterogeneidad y el número de minicírculos difiere entre cepas de la misma especie <sup>29</sup>.

El kinetoplasto contiene una masa de ADN circular que consta de miles de minicírculos (~1 Kb cada uno) y varias docenas de maxicírculos (~23 Kb cada uno). Los maxicírculos codifican genes homólogos a los presentes en el ADN mitocondrial de otros eucariotas. Estos genes codifican para proteínas mitocondriales esenciales y ARNr mitocondrial. De manera notable, algunos

de los genes codificantes de proteínas por los maxicírculos están encriptados. Para generar ARNm funcionales, los transcritos encriptados codificados por los maxicírculos pasan por un proceso de edición de ARN. La información genética para la edición del ARN es proporcionada por moléculas de ARN guía que son codificadas mayormente por los minicírculos <sup>44</sup>.

El ADNk es tradicionalmente la secuencia diana utilizada con más frecuencia para la detección de *Leishmania* debido a su naturaleza de copias múltiples, lo que permite alcanzar una alta sensibilidad diagnóstica en pruebas moleculares aplicadas en muestras clínicas <sup>45</sup>.

#### *El ADN de minicírculo del kinetoplasto: composición y aspectos genéticos*

El minicírculo está conformado por aproximadamente 10 clases de minicírculos. Cada minicírculo está compuesto por una región conservada que contiene el origen de replicación y una región variable que codifica generalmente un solo ARN guía. Estos últimos están involucrados en la maduración de los ARN mensajeros codificados por los maxicírculos a través de un mecanismo de edición de ARN.

Un minicírculo tiene un tamaño entre 600-800 pb en los miembros del género *Leishmania*. El minicírculo se divide en una región conservada de aproximadamente 150-200 pb (determinado de la evaluación en diferentes especies de *Leishmania*) y una región variable de alrededor de 600 pb. La primera región se subdivide en tres bloques de secuencias conservadas y de

longitud variable denominadas CSB1, CSB2 y CSB3 (Figura 3). Estas secuencias están conservadas en todo el género *Leishmania* y también en algunos otros tripanosomátidos. Mientras que la región variable permite una discriminación precisa entre las especies de *Leishmania* y entre cepas <sup>43-46</sup>.

### **3.4 Biomarcador ADNk y diagnóstico molecular de leishmaniasis basado en la PCR**

La PCR es uno de los métodos más sensibles para el diagnóstico de infección por *Leishmania* spp. La sensibilidad de este método depende principalmente de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia diana (región conservada en las especies que se desea detectar y multicopia para maximizar la sensibilidad). Aquí destaca el uso del biomarcador ADNk de naturaleza multicopia que está presente en aproximadamente 10,000 copias por parásito, por lo que es una diana ideal para la detección altamente sensible de *Leishmania* <sup>46,47</sup>. Como lo demuestra el trabajo de Jara y colaboradores donde emplearon el biomarcador ADNk para detectar y cuantificar parásitos de *Leishmania* en lesiones de pacientes con LC crónica y LM que se caracterizan por presentar carga parasitaria baja <sup>48</sup>.

Las regiones conservadas son dianas eficaces para la amplificación por PCR de todas las clases de micocírculos presentes en todas las especies de *Leishmania*. Sin embargo, se han demostrado polimorfismos en la región CSB-1 de *L. infantum* y en la región CSB-2 de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo <sup>47-49</sup>. En general, el diseño de cebadores en regiones conservadas de

minicírculos identifican los parásitos de *Leishmania* solo a nivel de género o subgénero <sup>50</sup>.

La muestra biológica utilizada (por muestreo invasivo: biopsia y raspado con lanceta; por muestreo no invasivo: hisopado, citocepillo e impresión de lesiones con papel filtro) también influye en la sensibilidad de detección molecular <sup>51,52</sup>. Los métodos basados en la PCR (punto final, PCR-*nested*, PCR en tiempo real) se utilizan en los análisis de laboratorio como pruebas confiables y confirmatorias de infección por *Leishmania*. En el caso de la PCR cuantitativa (qPCR) se requiere instrumentación sofisticada; la amplificación y detección simultánea demora entre 2-3 horas, se requiere reactivos de biología molecular más costosos y un laboratorio bien equipado con personal entrenado, mientras que en la PCR convencional el procesamiento es más accesible pudiéndose emplear termocicladores portátiles como el Palm PCR™ <sup>53</sup> o Bento Lab® <sup>54</sup>; en este último caso los amplicones pueden visualizarse por electroforesis en geles de agarosa.

### **3.5 Tecnología CRISPR-Cas**

Los estudios previos al descubrimiento de los sistemas CRISPR tuvieron lugar en 1987 cuando Ishino *et al.* hallaron una secuencia de ADN repetitiva inusual en *Escherichia coli* K12 <sup>55</sup>. Los investigadores describieron por primera vez el locus CRISPR correspondiente al gen *iap* responsable de la conversión de la isoenzima fosfatasa alcalina. Esta secuencia presentaba cinco características estructurales comunes: múltiples repeticiones directas cortas, secuencias

espaciadoras no repetitivas entre repeticiones de similar tamaño, una secuencia líder común de varios cientos pares de bases, la ausencia de un marco de lectura abierto largo y la presencia del gen *Cas1* acompañado de *Cas2-4*<sup>55,56</sup>.

Posteriormente en los años 2000 se realizó el descubrimiento en el ADN de bacterias y arqueas de un locus al cual se le denominó CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) y proteínas Cas efectoras asociadas a CRISPR. Este sistema CRISPR-Cas proporciona a los microorganismos un sistema de inmunidad adaptativa contra virus o plásmidos, mediante enzimas nucleasas guiadas por pequeños CRISPR ARN (crARN). Este complejo Cas-crARN permite degradar secuencias específicas de los ácidos nucleicos foráneos de manera precisa<sup>57</sup>.

Los sistemas CRISPR-Cas se clasifican según las estructuras de los genes *Cas* asociados a CRISPR. De acuerdo a la arquitectura del módulo de interferencia se agrupan en clase 1 aquellos sistemas formados por un complejo de varias proteínas Cas entre los que se encuentran los tipos I, III y IV, y en la clase 2 los sistemas que contienen una sola proteína Cas donde se encuentran los tipos II, V y VI. La enzima Cas9 es del tipo II mientras que en el grupo de las proteínas efectoras de clase 2 tipo V se encuentra la enzima Cas12 y en el tipo VI, la enzima Cas13, cuyas dianas son ADN y ARN, respectivamente<sup>58</sup>.

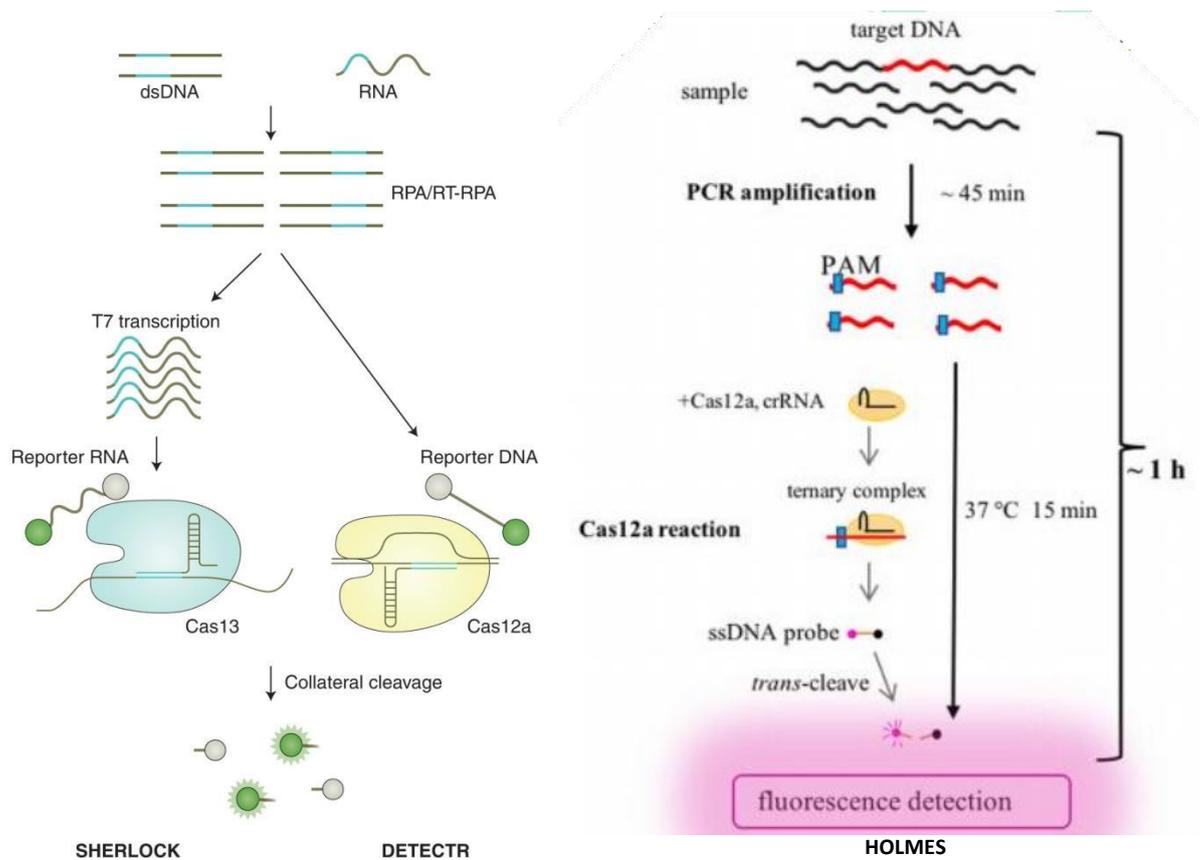
En 2012, Jinek y colaboradores realizaron un estudio donde demostraron que el sistema CRISPR-Cas9 (de tipo II) podía programarse con moléculas de ARN individuales para escindir sitios de ADN específicos y su posible uso en edición

génica, lográndose más adelante su implementación en este campo <sup>59</sup>. El primer reporte de la aplicación de las plataformas CRISPR en la detección de patógenos lo realizaron Pardee y colaboradores, quienes utilizaron el diagnóstico basado en CRISPR-Cas9 para detectar al virus del Zika <sup>60</sup>. El sistema involucró la amplificación isotérmica del ARN y la lectura por colorimetría basada en riboreguladores sintéticos programables (sensores *toehold switch*). Posteriormente otro grupo de investigación empleó esta tecnología para detectar bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina <sup>61</sup>.

Más adelante, en 2017, Gootenberg y colaboradores desarrollaron una plataforma de detección basada en CRISPR/Cas13a denominada *specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking* (SHERLOCKv1). La enzima Cas13a es una ARNasa que reconoce y escinde una diana monocatenaria de ARN guiada por un ARN guía (denominado crARN). Ellos lograron detectar el virus del dengue y Zika mediante la técnica de amplificación isotérmica RPA acoplada a escisión colateral de sondas reporteras por Cas13a. Con su plataforma implementaron un protocolo de preparación de muestras simplificado y rápido, detección y una lectura visual que se logra por el uso de tiras de flujo lateral. Esta fue la primera evidencia del potencial de esta tecnología como sistema de detección de agentes patógenos <sup>16</sup>. Posteriormente desarrollaron la versión SHERLOCKv2 con capacidad de *multiplexing*, mostrándose el potencial de mediciones cuantitativas.

Un año después, en 2018, Chen y colaboradores reportaron otra plataforma denominada *DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter* (DETECTR), emplearon esta vez el sistema CRISPR-Cas12a que media el corte de ADN asociado a la enzima Cas12a. Esta enzima tiene la capacidad de desencadenar la actividad de ADNasa monocatenaria no específica tras la unión al ADN diana dependiente del crARN. Esta actividad de escisión colateral y un paso de pre-amplificación de la diana de interés por amplificación isotérmica RPA se utilizaron para lograr una detección rápida y específica del virus papiloma humano en cultivos celulares de líneas cancerígenas y muestras clínicas con una alta sensibilidad <sup>17</sup>.

El ADN o ARN se amplifican mediante RPA o RT-RPA, respectivamente. Para las enzimas CRISPR dirigidas al ARN (incluida Cas13a), el producto de RPA amplificado se transcribe con la ARN polimerasa T7 en ARN. La unión del crARN a la secuencia diana complementaria activa a la enzima Cas y desencadena la escisión colateral de las sondas reporteras fluorescentes. Por tanto, Cas13a (usado en SHERLOCK) o Cas12a (usado en DETECTR) indican la presencia de secuencias diana de ARN o ADN, respectivamente (Figura 4). En ese mismo año, Li y su equipo de investigadores presentaron la plataforma *One-hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System* (HOLMES) que se basa en una amplificación por PCR seguido de la detección con CRISPR/Cas12a del ADN/ARN diana (Figura 4).



**Figura 4.** Estrategias de detección molecular de patógenos basadas en los sistemas CRISPR-Cas. Tomada de Kaminski *et al.* 2021 (panel izquierdo) <sup>62</sup> y Li *et al.* 2018 (panel derecho) <sup>18</sup>.

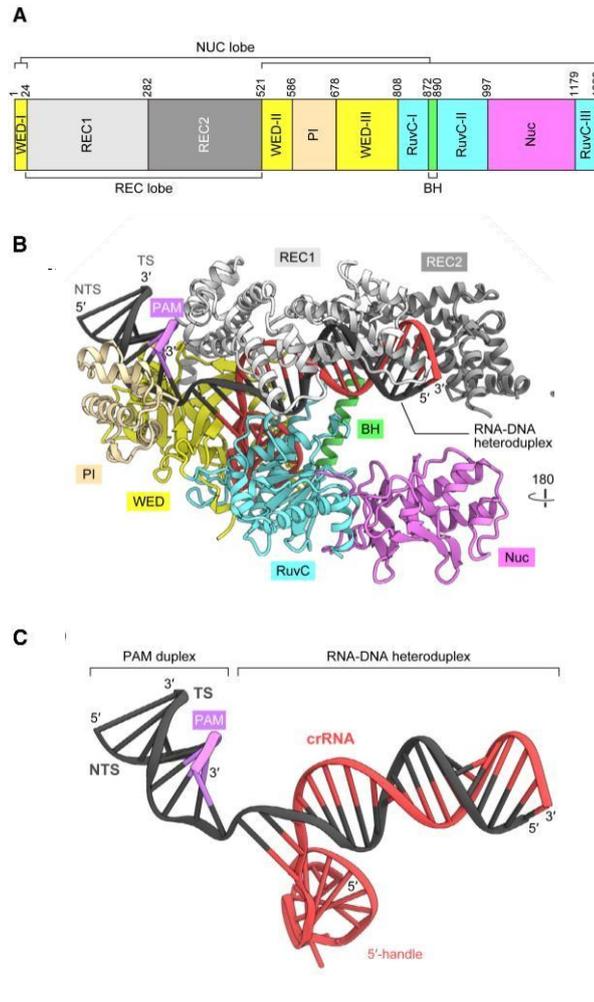
Por ejemplo, se utilizó para detectar virus de ADN y ARN como el virus causante de pseudorabia y el virus de la encefalitis japonesa, respectivamente, logrando alcanzar una alta sensibilidad (de nivel atómico) <sup>18</sup>.

Además, los estudios mencionados mostraron que estos sistemas podían discriminar diferencias de una sola base (mutaciones puntuales) en diferentes posiciones en la secuencia de ácido nucleico de interés.

### 3.6 Mecanismo de reconocimiento y corte por Cas12a

La endonucleasa Cas12a posee una longitud de 1200-1500 aminoácidos y un peso molecular de 150 kDa<sup>63,64</sup>. En el sistema CRISPR nativo, Cas12a es una ADNasa multidominio de estructura bilobulada conformada por el lóbulo de reconocimiento que incluye al dominio *wedge* que conecta el dominio Nuc y el dominio Rec1 que permite el reconocimiento de la secuencia diana; y el lóbulo nucleasa conformado por el dominio PI, región que interactúa con el motivo adyacente al protoespaciador (PAM)<sup>65</sup>(Figura 5). El dominio Nuc está involucrado en la unión, formación del *R-Loop* y escisión de la hebra de ADN diana. Finalmente, el dominio catalítico RuvC está encargado de escindir ambas cadenas de la secuencia diana<sup>66-68</sup>.

El proceso inicia con la localización de la región de corte, para ello se requiere la formación del complejo Cas12a-crARN que explora el ADN bicatenario en búsqueda de una secuencia corta denominada PAM rica en timina (5'-TTTV-3'(V = G/C/A) ubicada en el extremo 5' del ADN diana, adyacente a la secuencia complementaria al crARN. Tras el reconocimiento de PAM, la desestabilización local del dúplex de ADN se facilita a través de un mecanismo de "*phosphate locking*" conservado en todas las enzimas efectoras Cas que se unen a ADN de doble hebra.



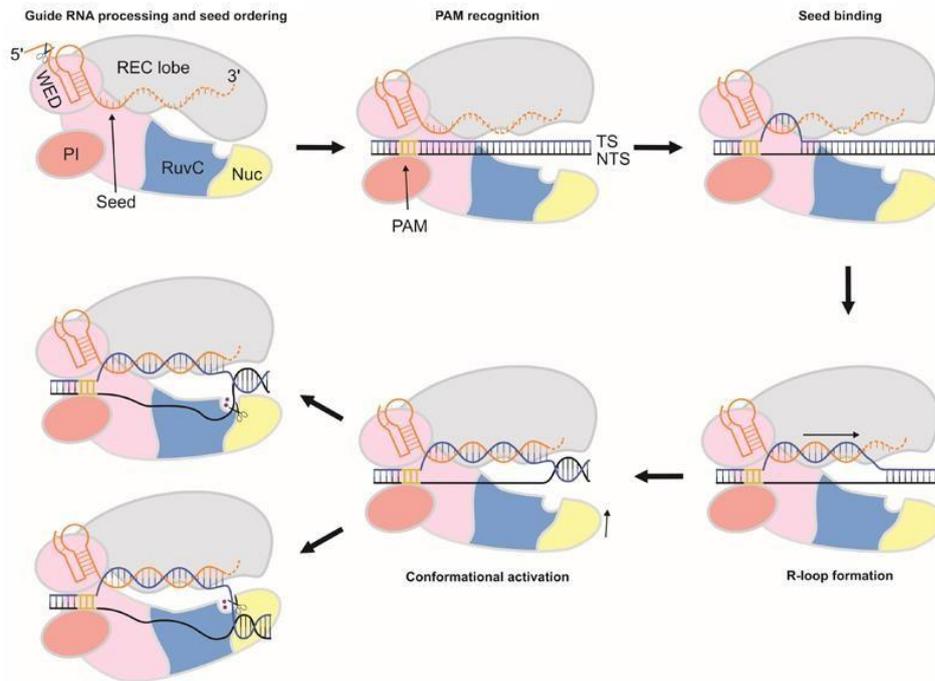
**Figura 5.** Composición y estructura de la enzima nucleasa Cas12a.

(A) Organización de los dominios de LbCpf1. RuvC, dominio catalítico. WED, dominio de unión a oligonucleótidos. REC, dominios de reconocimiento hélice alfa. BH, hélice puente. PI, dominio de interacción con el PAM. Nuc, dominio nucleasa. (B) Estructura cristalina de *LbCpf1* en complejo con el crARN y su ADN diana. (C) Estructura del crARN y su ADN diana <sup>65</sup>.

Posteriormente, se produce la hibridación de bases entre el crARN y el ADN diana donde aproximadamente los primeros 5-8 nucleótidos que componen el crARN forman la región “semilla” que es fundamental para la afinidad y especificidad por la diana. La hibridación del heterodúplex ARN:ADN genera el desplazamiento de la hebra de ADN no complementaria al crARN (y permite

su asociación con el sitio activo de RuvC) formándose así un complejo estable denominado bucle R (o *R-Loop*). Este proceso induce cambios conformacionales en Cas12a que involucran la rotación de los dominios REC, que junto con el dominio RuvC conducen la interacción con regiones específicas del crARN <sup>65-67</sup>.

Esto permite que Cas12a se active catalíticamente y actúe como desoxirribonucleasa. El dominio RuvC realiza primero la escisión en *cis*, a través de su centro catalítico único, de la hebra de ADN no complementaria al crARN desplazada y, en segundo lugar, produce el corte escalonado de la hebra de ADN diana unida al crARN <sup>68</sup>. Esto último genera extremos cohesivos con 4-5 nucleótidos salientes en la región distal al PAM. Dado que la ADNasa Cas12a permanece activada tras la unión específica al ADN diana (formación del heterodúplex), ello desencadena el corte en *trans* indiscriminado de moléculas de ADN monocatenario no específico <sup>69</sup>.



**Figura 6.** Modelo esquemático de la unión y escisión del ADN diana guiada por el complejo FnCas12a-crARN <sup>66</sup>.

### 3.7 Actividad colateral de la enzima Cas12a en la detección molecular de agentes patógenos

El sistema CRISPR/Cas12a para la detección molecular *in vitro* de agentes patógenos está compuesto por los siguientes componentes biomoleculares: la enzima Cas12a (que puede ser obtenida por técnicas de ADN recombinante o adquirirlas comercialmente), la secuencia diana (puede ser sintética u obtenida del ADNg del organismo de interés), el crARN (cuya secuencia guía o espaciadora consiste de 20-24 nucleótidos complementarios al ADN diana) y una sonda reportera, estos últimos elementos, de origen sintético.

Previo a la reacción CRISPR se requiere realizar un paso de amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana a través de técnicas de amplificación

convencionales como PCR o isotérmicas donde destacan RPA, LAMP, RAA (amplificación asistida por recombinasa) o la amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) <sup>56</sup>.

El inicio de la reacción CRISPR en condiciones *in vitro* involucra la formación de un complejo binario compuesto por la ADNasa Cas12a y el crARN específico que al reconocer una secuencia PAM en la diana de interés provoca la hibridación del crARN con la hebra de ADN diana complementaria y se produce la escisión secuencial en *cis* de cada una de las hebras del ADN bicatenario. Tras la unión, el reconocimiento (principalmente) y corte de la diana específica se desencadena la actividad endonucleasa colateral inespecífica de Cas12a. Gracias a esta actividad colateral secundaria, un sustrato de ADN monocatenario reportero sensor (que contiene un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' y un apagador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3') será cortado y producirá una señal fluorescente que puede ser medible en tiempo real con un equipo lector de fluorescencia o fluorímetro, o visualizada adaptando el sistema a tiras de flujo lateral <sup>17,18</sup>.

Los estudios de los sistemas CRISPR/Cas12a aplicados a la detección de agentes patógenos virales, bacterianos o protozoos son diversos. Un trabajo de gran impacto en el área de diagnóstico ha sido el realizado por Broughton y colaboradores, quienes utilizaron la plataforma DETECTR con pre-amplificación por RT-LAMP para detectar el virus de SARS-CoV-2 en muestras clínicas de hisopado (n = 78) y encontraron 95% de concordancia de

resultados positivos y 100% de concordancia de resultados negativos con la prueba estándar qPCR <sup>70</sup>.

Se resaltan los trabajos realizados en *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agente causal de la tuberculosis, en donde se comparó el desempeño diagnóstico de una prueba CRISPR-MTB (RPA/CRISPR-Cas12a) con el cultivo y el ensayo GeneXpert MTB (Xpert) para identificar MTB en diversas formas de muestras clínicas directas. Se obtuvo una alta sensibilidad en la prueba basada en Cas12a respecto a las otras pruebas, demostrándose así su utilidad potencial en el diagnóstico de la tuberculosis clínica <sup>20</sup>. En otro trabajo realizado por Xiao y colaboradores, los autores utilizaron el sistema PCR/CRISPR-Cas12a para la detección e identificación de MTB y micobacterias no tuberculosas (NTM) en 72/73 aislados clínicos y demostraron que esta prueba puede ser un medio de identificación rápida, precisa de especies de MTB y NTM <sup>21</sup>. Luego, Xu y colaboradores evaluaron y compararon el desempeño clínico del método de cultivo con la plataforma RPA/CRISPR-Cas12 para la detección de MTB en 193 muestras, obteniendo una sensibilidad del 99.3% y una especificidad del 100% <sup>22</sup>.

Esta tecnología también se ha aplicado en protozoos patógenos como *Plasmodium*, agente causal de la enfermedad de malaria. Dos grupos de investigación utilizaron la plataforma SHERLOCK (RPA/CRISPR-Cas) para detectar especies de *Plasmodium*. El grupo de Cunningham y colaboradores validó la prueba basada en RPA/CRISPR-Cas13a comparándola con la PCR en tiempo real en un panel de 123 muestras y encontraron que esta plataforma de

detección tiene una sensibilidad y especificidad del 94% <sup>23</sup>. En otra investigación, Lee y colaboradores trabajaron con la plataforma SHERLOCK (RT-RPA/CRISPR-Cas12a) y la optimizaron utilizando componentes liofilizados y realizando todo el proceso en una sola reacción. De esta manera lograron implementar una prueba diagnóstica aplicable en campo en el punto de atención/punto de cuidado (POC, por sus siglas en inglés *–point-of-care–*), para la detección ultrasensible de especies de *Plasmodium* (*P. falciparum* y otras especies distintas a *P. falciparum*) causantes de malaria e infecciones asintomáticas. Además, encontraron una concordancia del 100% de sus resultados con respecto a PCR cualitativo especie-específico (ARUP Laboratories, EE.UU.) y al test de diagnóstico rápido BinaxNOW® Malaria (Alere, EE.UU.) que detecta antígenos de *Plasmodium* spp. <sup>24</sup>.

### **3.8 Cinética enzimática de la endonucleasa Cas12a para la detección *in vitro* de ácidos nucleicos**

El ensayo de detección CRISPR involucra dos reacciones (pasos): la primera se produce cuando el reconocimiento del ADN diana activa la enzima y se realiza la escisión en *cis*; la segunda cuando la enzima activada corta indiscriminadamente ADN de hebra simple (*ssDNA*), denominada escisión en *trans*. El *ssDNA* utilizado como sustrato en la escisión en *trans* es la sonda reportera que se incorpora en la reacción de detección <sup>71</sup>.

Los análisis cinéticos bajo condiciones de *single-turnover* (que involucra colocar el complejo binario Cas12a-crARN maduro en exceso sobre el ADN diana) demostró un desenrollamiento lento de la cadena diana y formación del *R-loop* que precede

a la escisión del ADN unido a la enzima Cas12a <sup>72</sup>. El trabajo bioquímico-cinético previo realizado por Strohkendl y colaboradores demostró que el dominio RuvC se vuelve altamente activo en la formación del *R-loop* y rápidamente escinde *ssDNA* exógeno <sup>68</sup>. Por lo tanto, la escisión en *cis* es probablemente un paso limitante de la velocidad y está acoplada cinéticamente al proceso de activación de la escisión en *trans* de *ssDNA* que permite la detección *in vitro* <sup>72</sup>.

En la parte final del proceso de corte en *cis*, los fragmentos proximales al PAM escindidos por Cas12a se disocian muy lentamente, lo que limita a Cas12a a ser una enzima que cataliza una reacción (*single-turnover*) con el sustrato diana. Cas12a permanece unida firmemente al fragmento diana proximal al PAM en un estado conformacional que le permite catalizar múltiples rondas de escisión *trans* (*multiple turnover*) de ácidos nucleicos de secuencia no-específica, preferentemente de hebra simple, por 2 horas o más a 37°C. La escisión en *trans* (actividad colateral) mediada por Cas12a puede ser descrita según el modelo cinético de Michaelis-Menten <sup>68, 72</sup>.

Nalefski y colaboradores estudiaron, mediante la realización de un análisis cinético, los pasos que conducen a la activación del dominio RuvC de LbCas12a guiado por el crARN y la escisión *trans*. Bajo condiciones de ‘*steady state*’ y considerando un sustrato de *ssDNA* en *cis*, Nalefski y col. determinaron los valores de los parámetros cinéticos, tales como la constante catalítica, la constante de Michaelis-Menten y la eficiencia catalítica de LbCas12a, obteniendo:  $K_{cat} = 1.3 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 2.6 \times 10^{-8} \text{ M}$  y  $K_{cat}/K_M = 5.1 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , respectivamente <sup>72</sup>.

### 3.9 Ventajas y limitaciones de las plataformas CRISPR/Cas

Las plataformas CRISPR/Cas han podido ser adaptadas para lograr la detección de varios agentes patógenos, tales como el virus del SARS-CoV-2, agente causal de la enfermedad de COVID-19 que provocó la actual pandemia, donde se produjo un incremento exponencial de las investigaciones asociadas a la tecnología CRISPR <sup>70</sup>. Esto debido a su menor dependencia de reactivos procedentes de empresas comerciales, dado que algunos componentes biológicos como la enzima Cas y el crARN pueden producirse localmente. La enzima Cas puede producirse en bacterias *Escherichia coli* como proteína recombinante a partir de un plásmido de expresión del gen codificante respectivo (disponible en el repositorio Addgene; <https://www.addgene.org/>), seguido de su purificación <sup>16,17,75</sup>. El crARN es generado por transcripción *in vitro* a partir de moldes de *dsDNA* sintético <sup>76</sup>. Como se ha descrito previamente, el paso de pre-amplificación convencional (por PCR) o isotérmica permite incrementar la sensibilidad de la prueba cuando se asocia a sistemas CRISPR/Cas. Estos últimos utilizados por sí solos tienen una sensibilidad de detección a nivel femtomolar. Para aplicaciones en diagnóstico clínico los sistemas CRISPR/Cas requieren ser acoplados a un paso de pre-amplificación a fin de alcanzar una sensibilidad a nivel atomolar <sup>16,17</sup>. De otro lado, la combinación del paso de amplificación con la detección basada en CRISPR produce dos rondas de especificidad, la primera dada por los cebadores empleados en la amplificación y la segunda por el crARN en la reacción CRISPR.

Otra de las ventajas de estas plataformas novedosas de detección son su tiempo corto de procesamiento en un rango de ~70-120 minutos (ese tiempo abarca desde la obtención del material genético por un método simplificado, el paso de pre-amplificación de la diana y la detección por CRISPR-Cas12a). El proceso puede prolongarse si se considera la etapa pre-analítica de preparación de las muestras biológicas para la extracción de ácidos nucleicos con kits comerciales.

Y principalmente está el hecho que estas plataformas permiten alcanzar una especificidad y sensibilidad de detección elevada, que es de relevancia clínica. Cabe resaltar que la lectura de resultados se puede dar por varias vías, en un equipo lector de fluorescencia, con tiras de flujo lateral e incluso a nivel visual con un transiluminador de luz azul, eliminando los procedimientos de verificación por electroforesis en gel de agarosa habitualmente empleados en las técnicas de amplificación convencionales. Entre las limitaciones tenemos que existen posibles riesgos de contaminación, lo que dada la alta sensibilidad del sistema podría generar falsos positivos <sup>77</sup>. Por ello se recomienda trabajar en áreas separadas las distintas fases del ensayo y mantener un flujo unidireccional durante los procesamientos con el fin de minimizar y/o evitar contaminaciones. Es importante, además, incluir los distintos controles (positivos y negativos) del proceso de amplificación, así como de la reacción CRISPR. De ser posible, se sugiere incluir un control negativo del proceso de extracción de ácidos nucleicos cuando se trabaja con muestras clínicas.

### 3.10 Factores que influyen en el desempeño de la reacción CRISPR-Cas12a *in vitro*

#### 3.9.1 La selección de la enzima Cas12

La unión de Cas12a al ADN diana es funcionalmente irreversible. Cas12a logra discriminar *mismatches* con el ADN diana que se producen más allá de la región “semilla” del crARN (región que define la especificidad en el reconocimiento de la secuencia diana). La propagación del *R-loop* es fácilmente reversible, lo que permite que Cas12a pueda seleccionar secuencias de ADN con mayor precisión que Cas9 <sup>68</sup>.

La endonucleasa LbCas12a (anteriormente conocida como LbCpf1, proveniente de la bacteria *Lachnospiraceae bacterium* ND2006) ha sido identificada y caracterizada bioquímicamente. Estudios de cinética indican que LbCas12a exhibe una mayor actividad de escisión *trans* que sus ortólogos AsCas12a (*Acidaminococcus* sp.) o FnCas12a (*Francisella novicida*) <sup>64</sup>. El análisis estructural de LbCas12a mostró que esta enzima contiene un solo dominio RuvC, que procesa el crARN precursor a crARN maduro (gracias a su actividad endoribonucleasa), escinde la diana *dsDNA* o *ssDNA* y luego ejecuta la escisión en *trans* inespecífica <sup>78</sup>.

Según el trabajo realizado por Zhong y colaboradores, LbCas12a demostró poca o ninguna tolerancia a los *mismatches* en el ADN diana en células de mamíferos en estudios de edición génica <sup>79</sup>.

LbCpf1 y AsCpf1 se caracterizan porque requieren una secuencia de nucleótidos específica, llamada motivo adyacente al protoespaciador (PAM), para el reconocimiento del ADN diana. Además de reconocer un PAM canónico 5'-TTTV-3' (V es A, G, o C), estas enzimas reconocen PAM subóptimos que contienen citosinas (C). De hecho, un estudio reciente demostró que LbCpf1 y AsCpf1 pueden modificar los sitios diana que contengan PAM no canónicos, como CTTA, TCTA y TTCA en células de mamíferos, aunque con eficiencias más bajas que aquellos con PAM canónico 5'-TTTV-3' <sup>80</sup>.

### 3.9.2. La razón estequiométrica Cas12:crARN

La magnitud de la actividad *trans* nucleasa varía dependiendo de las características del ARN guía (crARN) que se utilice, específicamente la composición y longitud de la secuencia diana <sup>81</sup>. Investigaciones a nivel molecular y bioquímico han demostrado que la secuencia PAM y la región de las bases 1 a 7 en el crARN (región semilla) son esenciales para el reconocimiento de la secuencia diana por Cas12a <sup>82,83</sup>.

Existen diversos factores para potenciar e incrementar la eficiencia de la actividad colateral siendo la relación molar Cas12a:crARN uno de los principales, dado que la interacción entre el complejo binario Cas12a:crARN y el ADN diana es el proceso que media la velocidad de la escisión en *trans* en la reacción CRISPR <sup>68,73</sup>. En la literatura se encontró variaciones en la relación molar Cas12a:crARN empleada, por ejemplo, las más utilizadas en estudios estructurales son las proporciones 1:1 y 1:1.2 <sup>66,67</sup>, mientras que las empleadas en la detección molecular de diversos patógenos varían entre 1:1.25, 1:1.4, 1:1.5 y 1:2 <sup>19,64,82</sup>.

### 3.9.3. Características de la sonda reportera

La composición de la sonda reportera en sí misma puede afectar la actividad de escisión colateral (*trans*) de LbCas12a. Esta enzima escinde sustratos de *ssDNA*, *dsDNA* así como *ssARN*. En el caso de *ssDNA*, la longitud de la secuencia de nucleótidos puede ser de 5 (mayormente reportada en trabajos de detección), C<sub>10</sub> y hasta C<sub>20</sub>. Las sondas de longitud mayor tienen una tasa de corte hasta dos veces más rápida que las de C<sub>5</sub>. La composición de la secuencia debe ser rica en piridiminas (principalmente timinas) pues permite incrementar la tasa de escisión de la endonucleasa Cas12a <sup>72</sup>.

Además, se ha reportado que LbCas12a logra la actividad de escisión *trans* máxima con los fluoróforos FAM o HEX <sup>19</sup>.

#### **IV. Pregunta de investigación y objetivos**

##### *Pregunta de investigación*

En el presente estudio nos planteamos la pregunta de investigación si el sistema CRISPR-Cas12a dirigido a la diana genética multicopia ADNk será capaz de detectar a especies representativas de *Leishmania* del subgénero *L. (Viannia)* en muestras de lesiones de piel de pacientes con leishmaniasis cutánea y a partir de ello proporcionar la prueba de concepto de un método molecular nuevo para la detección altamente específica y sensible de especies de *L. (Viannia)* de relevancia médica en Latinoamérica.

##### *Objetivos*

##### ***Objetivo general***

Desarrollar y evaluar un método potencial de detección molecular de *Leishmania (Viannia)* spp. basado en el sistema CRISPR-Cas12a en combinación con pre-amplificación por PCR empleando como biomarcador multicopia el ADNk.

##### ***Objetivos específicos***

- Determinar las condiciones óptimas y la sensibilidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk de *Leishmania* spp. utilizando ADN genómico extraído de promastigotes de la cepa de referencia *L.(V.)braziliensis* MHOM/BR/75/M2904.
- Evaluar la especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk para detección de *Leishmania (Viannia)* spp. utilizando ADN genómico extraído

de promastigotes de cepas de referencia de distintas especies de *Leishmania* (pertenecientes a subgéneros *Viannia* y *Leishmania*), y de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

- Evaluar el desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk para detección de *Leishmania (Viannia)* spp. en muestras de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea, utilizando el ensayo de PCR en tiempo real como prueba de referencia.

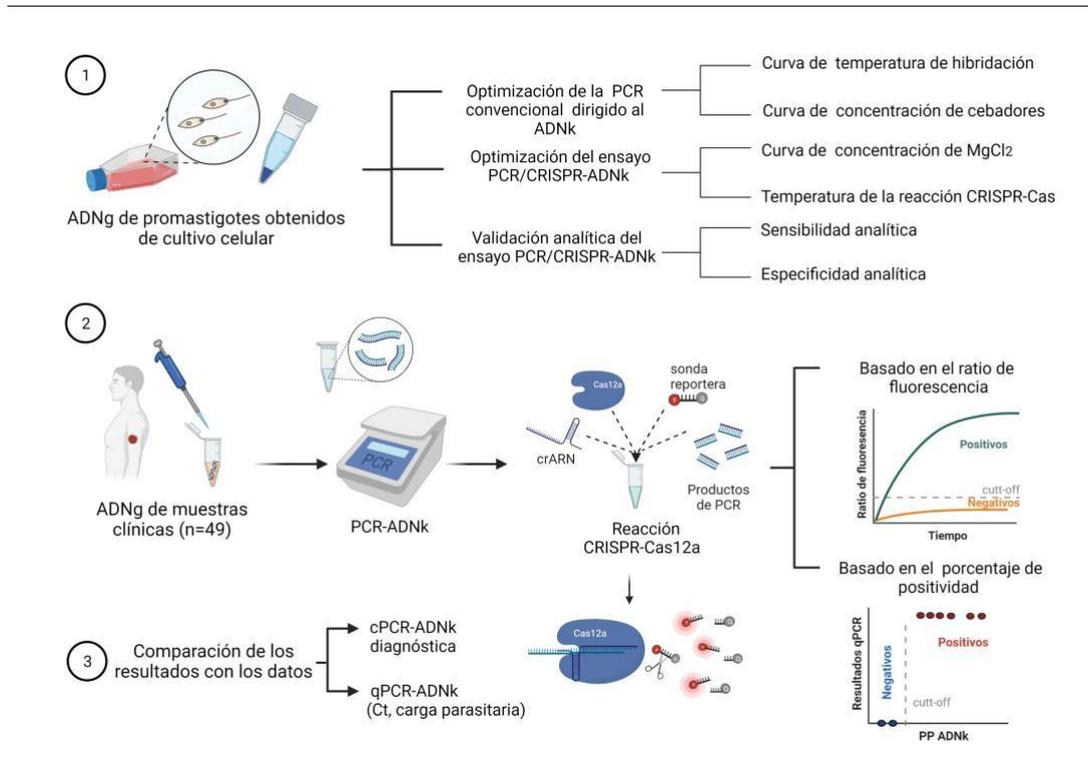
## V. Materiales y métodos

### 5.1 Diseño del estudio

El presente trabajo de investigación experimental-descriptivo es parte del proyecto “Desarrollo de una plataforma biosensora basada en CRISPR para la detección rápida y ultrasensible de microorganismos patógenos de importancia médica: leishmaniosis como “prueba de concepto”, financiado por ProCiencia, CONCYTEC - Banco Mundial mediante convenio N° 036-2019-FONDECYT-BM-INC.INV, a cargo de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) en colaboración con la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

El estudio se dividió en tres etapas (Figura 7). La primera consistió en la optimización de los sistemas de amplificación y detección de la diana de interés: PCR de punto final y CRISPR-Cas12a, respectivamente, teniendo en cuenta protocolos base seleccionados de la revisión de literatura científica. Una vez determinadas las condiciones *in vitro* óptimas, se procedió a la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk para la detección de ADN de *Leishmania* empleando un panel de cepas de referencia. En la segunda etapa se evaluó el protocolo establecido en un panel de muestras clínicas de pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniasis cutánea por cPCR-ADNk (PCR convencional, prueba utilizada en la rutina diagnóstica de LC <sup>84</sup>). El procesamiento de las muestras por la prueba de PCR/CRISPR-ADNk se realizó en ciego (las muestras fueron recodificadas por otra persona miembro del Laboratorio de Biomoléculas en UPC). Una vez completado el procesamiento, se levantó el ciego y se tuvo acceso a los resultados de la prueba de PCR cuantitativa en tiempo

real (qPCR-ADNk) <sup>48</sup>. Finalmente, se comparó el nivel de concordancia de los resultados de detección del ADNk de *Leishmania* entre las pruebas de PCR/CRISPR-ADNk, cPCR-ADNk <sup>84</sup> y qPCR-ADNk <sup>48</sup>; esta última se empleó como prueba de referencia dada su alta sensibilidad y especificidad diagnóstica.



**Figura 7.** Flujograma del trabajo experimental durante la optimización y evaluación del desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk. Figura creada con BioRender.com

## 5.2 Consideraciones éticas

El presente trabajo, registrado con el código SIDISI 205934 y que cuenta con aprobación por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH (carta del CIEI N° 091-10-22), empleó muestras de ADN derivadas de muestras de lesiones cutáneas positivas o negativas a infección por *Leishmania* (en base a la

prueba de cPCR-ADNk utilizada como prueba diagnóstica de rutina <sup>84)</sup> de pacientes que brindaron su consentimiento informado para el uso de sus muestras en investigación. Los pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis cutánea fueron reclutados en el Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco (HNAGV) en Cusco durante el periodo 2019-2020 como parte del proyecto en curso “Desarrollo de una prueba en formato de flujo lateral para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana en establecimientos de atención primaria de salud en zonas rurales endémicas del Perú” (financiado por FONDECYT - Banco Mundial, con convenio N° 095-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV) entre el HNAGV y el Laboratorio de Patho-antígenos, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH. El protocolo de dicho estudio (código SIDISI 103155) y el consentimiento informado fueron aprobados por el CIEI de la UPCH (carta de aprobación del CIEI N° 063-05-19 de fecha 30/01/2019 y renovada el 23/03/2021 con carta R-082-10-21).

### **5.3 Estimación del tamaño muestral**

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el estadístico Kappa ( $\kappa$ ), el cual proporciona una estimación del grado de concordancia entre dos pruebas tomando en cuenta el efecto de la aleatoriedad. Se consideraron los siguientes parámetros: un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y una potencia del 80% ( $1-\beta=0.8$ ), en la fórmula representada por  $\lambda(1,1-\beta,\alpha)$ , cuyo valor es de 7.849. Además, se tomó en cuenta como hipótesis nula  $H_0: \kappa_0 = 0.70$ , correspondiente a un valor de kappa que representa una concordancia buena; y como hipótesis alternativa, un valor de kappa esperado de  $H: \kappa_1 = 0.98$ . La razón de casos o prevalencia de la enfermedad en

zonas endémicas para leishmaniasis cutánea en Perú se estimó igual a 65% ( $\pi = 0.65$ ) en base a un reporte realizado por el Ministerio de Salud <sup>5</sup>. Finalmente se consideró un error de estimación de 3%. A partir de estos valores se calculó la cantidad de muestras a analizar empleando la siguiente fórmula <sup>85</sup>:

$$N = \lambda(1, 1 - \beta, \alpha) \left\{ \frac{[\pi(1 - \pi)(\kappa_1 - \kappa_0)]^2}{\pi^2 + \pi(1 - \pi)\kappa_0} + \frac{2[\pi(1 - \pi)(\kappa_1 - \kappa_0)]^2}{\pi(1 - \pi)(1 - \kappa_0)} + \frac{[\pi(1 - \pi)(\kappa_1 - \kappa_0)]^2}{(1 - \pi)^2 + \pi(1 - \pi)\kappa_0} \right\}^{-1}$$

$$56 = 7.845 \left\{ \frac{[0.65(1 - 0.65)(0.98 - 0.7)]^2}{(0.65)^2 + 0.65(1 - 0.65)0.7} + \frac{2[0.65(1 - 0.65)(0.98 - 0.7)]^2}{0.65(1 - 0.65)(1 - 0.7)} + \frac{[0.65(1 - 0.65)(0.98 - 0.7)]^2}{(1 - 0.65)^2 + 0.65(1 - 0.65)0.7} \right\}^{-1}$$

El número requerido de sujetos calculado fue de N=56 (N=58 con el error estimado). Se tuvo disponible un total de 49 muestras (36 muestras positivas y 13 muestras negativas a infección por *Leishmania* determinado por la prueba de cPCR-ADNk). Con este tamaño de muestra y conservando los demás parámetros, la potencia de la prueba es de 72%. Dados los objetivos del presente estudio de proporcionar la prueba de concepto de la prueba PCR/CRISPR-ADNk, este “n” muestral permitió realizar el análisis de concordancia (porcentaje de concordancia positivo y negativo) con respecto a la prueba de referencia qPCR-ADNk.

#### 5.4 Muestras biológicas

Se accedió a muestras de ADN genómico extraído a partir del cultivo axénico *in vitro* de promastigotes de 6 cepas representativas de distintas especies de *Leishmania* patógenas para el ser humano pertenecientes a los subgéneros *L.(Viannia)* y *L.(Leishmania)* para la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk. Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patho-antígenos, LID-UPCH. Además, se trabajó con ADN

genómico de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi* proporcionado por la Dra. Manuela Verástegui (Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas, LID-UPCH) para los ensayos de especificidad.

Los pacientes enrolados, para el estudio del proyecto arriba mencionado, quienes brindaron sus muestras, provienen principalmente de una zona endémica de LC del Perú, ubicada en la provincia de La Convención al norte del Departamento del Cusco entre los paralelos de 11° y 13° 28', Latitud Sur entre los meridianos 72 y 74 de longitud Oeste, cuyas altitudes oscilan entre los 500 m.s.n.m. – 3,500 m.s.n.m. desde la llanura Amazónica hasta los Nevados del Salkantay, Verónica y Quishuar, ubicándose la Ciudad de Quillabamba 1050 m.s.m. En la región de Cusco predominan las infecciones por *Leishmania (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* <sup>86</sup>.

En el laboratorio de Patho-antígenos se realizó la extracción de ADN utilizando el kit *High Pure Template Preparation* (Roche, Mannheim, Germany) y las muestras de ADN obtenidas se diluyeron en un volumen de 100-150 µL de buffer de elución. Posteriormente se cuantificaron las muestras por fluorimetría usando el kit *Quant-iT high sensitivity dsDNA assay* y el fluorímetro Qubit. Finalmente, las muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C.

Posteriormente, en el presente estudio se evaluaron muestras de ADN provenientes de 49 muestras clínicas que se obtuvieron a partir de lesiones cutáneas sospechosas de infección por *Leishmania*. La toma de muestras se realizó por distintos métodos: biopsia, raspado con lanceta, cepillado, impresión con papel filtro e hisopado. Estas

muestras fueron luego confirmadas positivas o negativas a infección por *Leishmania* con la prueba diagnóstica de rutina cPCR-ADNk<sup>84</sup>, realizada por Percy Huaihua, tesista de maestría del Laboratorio de Patho-antígenos, LID-UPCH. La evaluación del desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en dichas muestras clínicas se realizó en forma ciega en el Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud, UPC. De manera independiente las mismas muestras fueron evaluadas por la prueba de qPCR-ADNk<sup>48</sup> por P. Huaihua del Laboratorio de Patho-antígenos, LID-UPCH.

## **5.5 Diseño de ARN guía y cebadores específicos para una región conservada del ADN de minicírculos del kinetoplasto (ADNk)**

### **5.5.1 Diseño de ARN guía específico de minicírculos del ADNk**

En el sistema CRISPR-Cas12a, la enzima nucleasa Cas12a requiere un crARN para ser guiada hacia la diana genética de interés. La región guía (o espaciadora) del crARN es una secuencia de ~20-24 nucleótidos complementaria a la secuencia del ADN diana. Esta última comprende la región adyacente al PAM 5'-TTTV-3' y constituye el sitio de reconocimiento que va a permitir la formación del complejo Cas12a-crARN-ADN diana. La región espaciadora es la que le brinda especificidad al crARN.

El equipo de bioinformática del Laboratorio de Biomoléculas (UPC) utilizó el programa EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/>)<sup>87</sup> y diseñó los moldes

de ADN para la producción *in vitro* de crARN específicos del ADNk del subgénero *L.(Viannia)*.

El proceso inició con la identificación de regiones conservadas en secuencias de minicírculos del ADNk de *L. (Viannia)* spp. mediante alineamientos secuenciales. Primero se alinearon las secuencias correspondientes a un número de cepas superior a 10 de cada una de las especies más representativas del subgénero *L. (Viannia)*, tales como *L.braziliensis*, *L.guyanensis*, *L.lainsoni* y *L.panamensis*, obtenidas de la base de datos pública de secuencias genéticas GenBank del NCBI. Una segunda alineación se centró en todas las secuencias de minicírculos de ADNk de *L. braziliensis* disponibles en GenBank (409 secuencias) y se realizó de manera local utilizando el programa ClustalX<sup>88</sup> para Ubuntu. Las regiones conservadas en los minicírculos del ADNk en especies del subgénero *L.(Viannia)* se identificaron con el software AliView<sup>87</sup> y se buscó secuencias PAM dentro de estas regiones conservadas.

Adicionalmente, se utilizó la herramienta BLASTn para alinear las secuencias PAM y los sitios de reconocimiento (secuencia complementaria a la secuencia guía del crARN) con las secuencias de distintas especies de *Leishmania* disponibles en el GenBank, a fin de confirmar *in silico* la especificidad por especies del subgénero *L. (Viannia)*. Este análisis incluyó además las secuencias genómicas disponibles en GenBank de *Homo sapiens* (con la finalidad de minimizar posibles reacciones cruzadas con el genoma

humano), así como de especies de hongos (como *Sporothrix schenckii* y *Blastomyces*) y micobacterias (como *Mycobacterium leprae* y *M. tuberculosis*) que generan lesiones cutáneas similares a las observadas en LC (diagnóstico diferencial). Además, se consideró incluir en los análisis *in silico* las secuencias genómicas disponibles de especies de protozoarios parásitos filogenéticamente relacionados a *Leishmania* (como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*) y miembros del phylum Apicomplexa (*Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*) que pudieran producir reacción cruzada.

Finalmente se construyó un molde (*template*) de ADN de doble hebra (*dsDNA*) para producir el ARN guía (crARN), el cual está compuesto por una secuencia correspondiente al promotor de la ARN polimerasa T7 que permitirá se realice la transcripción *in vitro*, seguido de una secuencia de reconocimiento de 20 nucleótidos [complementaria a la secuencia de ADN diana; esta última debe encontrarse ubicada adyacente a la secuencia PAM (5' TTTV 3') que es esencial para el reconocimiento por la enzima Cas12a] y una secuencia de andamiaje o *scaffold* de 21 nucleótidos.

Para el caso del crARN específico de ARNasa P (gen humano empleado como control de calidad de las muestras clínicas) se consideró el molde de ADN para el gen *POP7* humano que codifica la ARNasa P subunidad p20, reportado en el trabajo de Broughton *et al* (2020) <sup>70</sup>.

### **5.5.2 Diseño de cebadores**

Para el proceso de pre-amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo de ADNk (paso previo a la reacción CRISPR-Cas12a), se buscaron cebadores candidatos manualmente (18-22 nt de longitud,  $T_m$  promedio de 60 °C) en las regiones previamente identificadas. A continuación, los candidatos a cebadores se alinearon contra el genoma humano usando NCBI BLAST y se descartaron si tenían más del 80% de identidad de secuencia y cobertura con cualquier secuencia humana. Luego se probó si se producía la formación de homodímeros y heterodímeros utilizando la herramienta OligoAnalyzer de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y se descartaron los cebadores con  $\Delta G < -7$  kcal/mol en cualquiera de los parámetros.

Para el gen humano ARNasa P, se seleccionaron cebadores reportados previamente<sup>75,90</sup>. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

### **5.6 Transcripción *in vitro* para la producción de crARN-ADNk y crARN-ARNasa P y su purificación**

Se utilizó el TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit según las recomendaciones del fabricante para la producción del crARN (ARN guía) específico de la diana de interés. Para ello se utilizaron los moldes de ADN de hebra doble (*dsDNA*) previamente diseñados y que fueron sintetizados por la empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

En la cabina de flujo laminar se prepararon reacciones independientes para cada biomarcador. Cada reacción contenía 8  $\mu\text{L}$  de buffer 5X, 16  $\mu\text{L}$  de un mix de ribonucleótidos (NTPs), 4  $\mu\text{L}$  de la enzima *TranscriptAid* (T7 ARN polimerasa) y 11  $\mu\text{L}$  de agua grado PCR. Luego a los 39  $\mu\text{L}$  de reacción de transcripción se agregó 100 pmoles del ADN molde de *dsDNA* específico en cada caso (concentración inicial de 100  $\mu\text{M}$ ) y se incubó a 37 °C por 3 h.

Luego se purificó el ARN empleando el Kit Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research) según las recomendaciones del proveedor. Para la cuantificación del ARN purificado se prepararon 3 diluciones 1/10 y se midieron por triplicado en el espectrofotómetro Nanodrop. Para el cálculo de la concentración molar de los crARNs producidos se tomó la media y la desviación estándar de los valores obtenidos y tomando como dato el peso molecular (PM) del molde del ADNk igual a 12433.8 g/mol se obtuvo la concentración final en micromolar.

De la misma manera se procedió para la producción del crARN-ARNasa P (ribonucleasa P) que fue empleada como control de calidad de muestra en la evaluación de las muestras clínicas. Luego se prepararon alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  del crARN sin diluir y fueron almacenadas a -80°C.

### **5.7 Curva de ADN genómico de *Leishmania (V.) braziliensis***

#### **MHOM/BR/75/M2904**

Con el objetivo de determinar la sensibilidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk se construyó una curva de ADN genómico (ADNg) de *Leishmania braziliensis* para tal fin primero se realizó el cálculo para determinar la cantidad de ADN equivalente a un parásito de *Leishmania* con base en el trabajo de Jara *et al.*

(2013) <sup>48</sup>. Se requirió de dos datos: el tamaño del genoma nuclear haploide de *L.(V.)braziliensis*([https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/dataset/TMPTX\\_lbra\\_MHOMBR75M2904\\_2019](https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/dataset/TMPTX_lbra_MHOMBR75M2904_2019)) de 33.15 Mb (33.15 x 10<sup>6</sup> pb) y el porcentaje de ADNk respecto al ADN nuclear que hay en un parásito <sup>42</sup>.

Considerando esta información se procedió a calcular el número de pares de bases en unidades de masa. Para ello se utilizó la fórmula para conocer la masa del genoma haploide que consiste en multiplicar el N° de pb del genoma por el equivalente de un pb en unidades de masa y finalmente multiplicar el equivalente de una mol en pb. Se tomó en cuenta que 1 pb es igual a 660 gramos/moles y que el número de Avogrado correspondiente a 1 mol es igual a 6.023 x 10<sup>23</sup> moléculas (equivalentes a pb). Se obtuvo que la masa del genoma haploide es igual a 0.0367 pg de ADN. Por consiguiente, un parásito (diploide) contiene 0.0734 pg (= 73 fg) de ADN genómico nuclear. El ADN del kinetoplasto representa el 15.8% del ADN total, es decir 11.53 fg. Entonces, se considera que en 1 e.g.p (equivalentes genómicos de parásitos ) hay 84.93 fg de ADN genómico total.

Se trabajó a partir de una alícuota de ADN genómico de la cepa M2904 de *Leishmania braziliensis* obtenido del cultivo axénico del parásito. Se cuantificó el ADN por triplicado en el espectrofotómetro Nanodrop obteniéndose en promedio 26.7 ng/μL. Considerando esta concentración se preparó una dilución 1:2 para obtener 8.9 ng/μL (stock de trabajo). La curva estándar comprende un rango de 5x10<sup>4</sup> a 5x10<sup>-3</sup> e.g.p/reacción y abarca 7 órdenes de magnitud. Para la elaboración de la dilución más alta (dilución 1) se dispensaron 90 μL de agua grado PCR y se

agregó 10  $\mu\text{L}$  del stock de ADN estándar (dilución 1:9) obteniéndose una concentración final de  $8.493 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$  (10 000 e.g.p). De la misma manera se prepararon las siguientes 7 diluciones seriadas, donde el punto más bajo contiene una concentración de ADN de  $8.493 \times 10^{-5} \text{ pg}/\mu\text{L}$  (0.001 e.g.p). Luego, esta curva estándar de equivalentes genómicos de parásitos de *Leishmania* se utilizó en el paso de pre-amplificación por la PCR, las reacciones fueron preparadas según el Anexo 3 y condiciones de ciclaje (Anexo 4). En cada reacción de la PCR se agregó 5  $\mu\text{L}$  de cada punto de la curva que parte de  $4.24 \times 10^3$  hasta  $4.25 \times 10^{-4} \text{ pg}$  (50 000 y 0.005e.g.p, respectivamente).

#### Preparación de controles de calidad

##### Controles positivos y negativos incluidos en la PCR

- Control de ADN humano: ADN genómico humano extraído de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano. El aislamiento de PBMC se realizó por el método de separación por densidad en gradiente de Ficoll. Se colocó en la reacción de PCR alrededor de 40 ng de ADN en total (se disponía de un stock de 20 ng/ $\mu\text{L}$ , del cual se tomó 2  $\mu\text{L}$  para la reacción de PCR).
- Control positivo de ADN de *Leishmania*: ADN genómico obtenido a partir del cultivo axénico de promastigotes de *Leishmania braziliensis* (cepa de referencia MHOM/BR/75/M2904). Se colocó en la reacción de PCR la cantidad de  $4.24 \times 10^3 \text{ pg}$  de ADN en total (alrededor de 50 000 e.g.p).
- Control negativo de PCR

-NTC2-PCR: se preparó una reacción de PCR en donde no se agregó ADN. El volumen de la reacción se completó con agua grado PCR.

-NTC1-PCR: se preparó una reacción de PCR en donde no se agregó ADN.

Este tubo se mantuvo cerrado sin la adición de agua grado PCR en reemplazo del ADN molde.

Ambos controles permiten monitorear posibles contaminaciones.

### **5.8 Optimización de la PCR de punto final para la pre-amplificación del ácido nucleico diana (ADNk)**

El proceso de pre-amplificación es un paso que incrementa la sensibilidad de detección del sistema CRISPR-Cas12a <sup>17</sup>. El método seleccionado fue la PCR de punto final debido a su versatilidad, robustez y sensibilidad, además, ésta es una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico basado en ácidos nucleicos <sup>18,62</sup>.

Para la preparación del master mix se utilizó *Dreamgreen Taq* (Thermo Fisher Scientific), una mezcla que contiene: buffer de reacción 2X, enzima *Taq* ADN polimerasa y MgCl<sub>2</sub>. Se trabajó con el protocolo de ciclaje reportado por López *et al.* (1993) con algunas modificaciones. Se evaluó una curva de temperatura de *annealing* y una curva de concentración de cebadores para cada par de cebadores. Cada experimento incluyó un control positivo (ADN genómico de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) y un control negativo sin ADN (NTC).

### **5.8.1 Curva de temperatura de hibridación de los cebadores para el biomarcador ADNk**

Se seleccionaron dos pares de cebadores para amplificar el ADNk. Se determinó la temperatura de *annealing* óptima de cada par de cebadores para lograr maximizar el rendimiento y garantizar la especificidad de la PCR. Se realizó una PCR de gradiente y se evaluó una curva con cuatro temperaturas de hibridación de 55, 57, 59 y 61°C con base en la temperatura de *melting* de los cebadores: par 1 (F: 60.7°C, R: 60.3°C) y par 2 (F: 62.5°C, R: 60.3°C). Se realizaron 35 ciclos de amplificación. Como control positivo se incluyó ADN sintético de *Leishmania*, este contiene la secuencia de reconocimiento del ADNk.

### **5.8.2 Curva de concentración de cebadores para el biomarcador ADNk**

El rango de concentración de cebadores recomendado para la PCR es de 0.1-1µM. Concentraciones excesivas de cebadores incrementan la probabilidad de hibridación incorrecta y generación de productos de PCR no específicos. Con el objetivo de optimizar el proceso de pre-amplificación, se probaron tres concentraciones finales de cebadores en la reacción de la PCR: 0.2, 0.3 y 0.5 µM, que fueron preparadas a partir de un stock de trabajo de 10 µM. Las reacciones se llevaron a cabo empleando una temperatura de *annealing* de 61°C.

Las condiciones de amplificación se trabajaron con base en el protocolo de López *et al.* (1993) <sup>84</sup> con algunas modificaciones. El programa de amplificación inició con un periodo de desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, luego 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

### **5.9 Optimización de la reacción CRISPR-Cas12a**

La reacción CRISPR se trabajó con base en el protocolo de Broughton *et al.* (2020) <sup>70</sup> y Alcántara *et al.* (2021) <sup>75</sup>, con algunas modificaciones.

El Mg<sup>+2</sup> es un factor crucial para el inicio de la actividad de la enzima Cas12a y, por tanto, se agregó a la reacción previo a la carga de muestras en la placa del equipo lector de fluorescencia. Por ende, se preparó previamente el buffer 1X de la enzima Cas12a sin MgCl<sub>2</sub>. Como paso siguiente se incubó el crARN-ADNk diluido 1/10 (36.5 pmoles del crARN) en agua grado PCR durante 10 minutos a 65°C para su desnaturalización y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente para su replegamiento (*refolding*). A continuación, se preparó el complejo CRISPR 10X y los componentes se mezclaron en el siguiente orden. Primero, se agregó el buffer 1X de la enzima Cas12a sin MgCl<sub>2</sub>. Segundo, se adicionó la enzima recombinante LbCas12a preparada *in house* y el crARN-ADNk en una razón estequiométrica de 1:1.5 (100 nM: 150 nM). Como último paso se añadió 2 µM de la sonda reportera (Anexo 5). Se homogenizó manualmente y la mezcla se pre-incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 10 minutos en oscuridad para promover la formación del complejo de ribonucleoproteína. Luego en una placa de 96 pocillos (de color negro, adecuada para ensayos de fluorescencia) se cargó 10 µL del complejo CRISPR 10X

y 90  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene 102  $\mu\text{L}$  buffer 1X de la enzima Cas12a y 6  $\mu\text{L}$  el producto de la PCR (ADN diana pre-amplificado) correspondiente. Finalmente se realizaron las lecturas en el equipo Synergy™ H1 (BioTek Instruments) según los parámetros descritos en el Anexo 6.

Se incluyeron los siguientes controles a la reacción CRISPR-Cas12a:

- Control positivo: se agregó al volumen de buffer 1X de la enzima Cas12a el producto de PCR del control positivo.
- Control humano: se agregó al volumen de buffer 1X de la enzima Cas12a el producto de PCR del control humano.
- Control negativo de la amplificación: se agregó al volumen de buffer 1X de la enzima Cas12a el blanco de reactivo de la PCR denominado NTC-PCR.
- Control negativo de la detección: no se agregó producto de PCR, en su lugar se completó el volumen de la reacción CRISPR con el buffer de la enzima Cas12a (este control se denominó NTC-CRISPR).

### **5.9.1 Curva de concentración de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )**

El ión  $\text{Mg}^{+2}$  es un factor importante para la reacción CRISPR debido a que permite incrementar la actividad de escisión en *cis* y acelerar la escisión *trans in vitro* mediada por la enzima LbCas12a <sup>19</sup>. Con el objetivo de determinar la concentración óptima de magnesio en la reacción CRISPR se probaron 5 concentraciones diferentes de  $\text{MgCl}_2$  en el buffer 1X de la enzima Cas12a, cuya concentración final en la reacción fue de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM.

El primer paso consistió en preparar tres reacciones de PCR de 25  $\mu$ L (Anexo 3) por duplicado, correspondientes al control positivo con ADN de *Leishmania*, control con ADN genómico humano y control negativo sin ADN (NTC-PCR). El protocolo de amplificación empleado se detalla en la sección Anexo 3. Luego se mezclaron las dos reacciones de cada control obteniéndose un volumen final de 50  $\mu$ L.

Como paso siguiente se realizó el *refolding* del crARN del ADNk previamente descrito. Paralelamente a partir de un stock de  $MgCl_2$  1M se prepararon cinco soluciones de buffer 1X de la enzima Cas12a con las distintas concentraciones de magnesio a evaluar. A continuación, se agregaron los productos de PCR correspondientes a los controles en cada tubo de reacción y adicionalmente se incluyó un control negativo denominado NTC-CRISPR.

En el último paso de la reacción CRISPR se trabajó con base en el protocolo de Broughton *et al.* (2020)<sup>70</sup> y Alcántara *et al.* (2021)<sup>75</sup> con algunas modificaciones (Anexo 5). Se cargó 10  $\mu$ L del complejo CRISPR 10X en los pocillos según el diseño de la placa y se agregó los 90  $\mu$ L correspondiente al producto de PCR diluido en el buffer 1X de la enzima Cas12a previamente elaborado. Finalmente se realizaron las lecturas de fluorescencia en el equipo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader por 120 minutos, de acuerdo a los parámetros descritos en el Anexo 6.

### **5.9.2 Evaluación de la temperatura de la reacción CRISPR-Cas12a**

La enzima Cas12a trabaja en un amplio rango de temperatura 25-42°C<sup>80</sup>. Previamente se ha reportado que la temperatura de 37°C acelera la actividad de la enzima LbCas12a en la reacción CRISPR<sup>17,70</sup>. Con el propósito de conocer el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima Cas12a durante la reacción CRISPR se probaron dos temperaturas de reacción: 25°C y 37°C. El procedimiento consistió en utilizar la curva estándar de ADNg de *Leishmania* en la pre-amplificación por PCR y paso seguido se realizó la reacción CRISPR con cada una de las temperaturas.

### **Validación analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk**

#### **5.10 Evaluación de la sensibilidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk**

Con la finalidad de determinar la cantidad mínima de ADN de *Leishmania* que es capaz de detectar el ensayo PCR/CRISPR-ADNk se realizaron tres experimentos independientes con cada par de cebadores diseñados para el biomarcador ADNk del minicírculo (denominados par 1 y par 2). Se utilizó una curva de ADN genómico (construída previamente según lo descrito en la sección 5.7) en la PCR de punto final. Posteriormente la reacción CRISPR se realizó según lo detallado en la sección 5.9.

### 5.11 Evaluación de la especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk

Los siguientes ensayos se realizaron con el propósito de evaluar la especificidad de la prueba PCR/CRISPR-ADNk para detectar exclusivamente *Leishmania (Viannia)* spp. Para estos experimentos se trabajó con ADN genómico extraído a partir del cultivo de 6 cepas de referencia de *Leishmania* spp. representativas de especies del Nuevo y Viejo Mundo pertenecientes a los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)* (Tabla 1). Además, para comprobar que el sistema logra discriminar otras especies de protozoos tripanosomátidos filogenéticamente relacionados, como el agente causal de la enfermedad de Chagas, el cual circula en áreas endémicas de leishmaniasis en Perú y regiones vecinas, se evaluó la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Primero se cuantificó el ADNg proporcionado en el espectrofotómetro Nanodrop y luego se evaluó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente en la reacción de la PCR se utilizaron dos pares de cebadores para el ADNk (evaluados en reacciones por separado) y se agregó una cantidad de ADN *input* de ~20 ng/μL (20 ng - 40 ng totales). Las reacciones CRISPR se prepararon según lo detallado en la sección 5.9. Una vez que se seleccionó el par de cebadores que en conjunto con el crARN-ADNk amplifica y detecta solo *L. (Viannia)* spp., los ensayos se realizaron independientemente por cuadruplicado (solo para el par 1 del ADNk).

**Tabla 1.** Cuantificación de ADNg de cepas de referencia de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*

Género /subgénero	Especie	Código OMS	[ ] ng/μL	A260/ 280	A260/ 230
Subgénero <i>Viannia</i>	<i>L.braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	29.9	1.60	0.89
	<i>L.peruviana</i>	MHOM/PE/90/LCA08	4.5	2.08	0.12
Género <i>Leishmania</i>	<i>L.amazonensis</i>	MPRO/BR/72/M1841	112.7	1.94	2.11
	<i>L.donovani</i>	MHOM/IN/80/DD8 (LEM 703)	40.7	1.89	1.10
	<i>L. major</i>	MHOM/SU/73/5ASKH	20.1	1.49	0.60
	<i>L.infantum</i>	MHOM/TN/80/IPT1	3.5	1.40	1.53
<i>Trypanosoma</i>	<i>T.cruzi</i>	MHOM/BR/00/Y	24.4	1.69	1.15

A, absorbancia; OMS, Organización Mundial de la Salud

### 5.12 Evaluación de la prueba de detección PCR/CRISPR-ADNk en muestras clínicas.

Se evaluó un panel de 49 muestras de ADN genómico extraído de lesiones cutáneas de pacientes con diagnóstico confirmado de LC (sección 5.4). Las muestras recibidas se recodificaron y como paso siguiente fueron diluidas 1/10 y cuantificadas en el espectrofotómetro Nanodrop. Para las pruebas de PCR/CRISPR se procesaron las muestras en grupos de 10 muestras (se tomó en cuenta las recomendaciones de las guías de control de calidad del procesamiento de muestras clínicas), teniéndose en total 5 grupos. El procesamiento se inició con las reacciones de PCR con el par 1 de cebadores definido específico de la región del minicírculo del ADNk y se realizó el procedimiento ya descrito en la sección 5.9. Como segundo paso se realizó la reacción CRISPR-Cas12a y en cada subgrupo de muestras procesadas se incluyeron ADN genómico de cultivo axénico de *Leishmania braziliensis* de la cepa M2904 como control positivo, el control de ADN humano de un paciente sano, NTC1-PCR, NTC2-PCR y NTC-CRISPR como

controles negativos. Adicionalmente se seleccionó al azar un grupo de 13 muestras del total (25%) para ser procesadas por segunda vez y así corroborar los resultados previamente obtenidos. El panel de muestras fue procesado en ciego para la detección de ADNk de *Leishmania* por PCR-CRISPR en el presente estudio.

Además, se realizó el ensayo PCR/CRISPR dirigido al gen ARNasa P como control humano con la finalidad de garantizar que un resultado negativo de la prueba no se deba a una cantidad insuficiente de ADN de la muestra, para controlar la inhibición de la PCR y los falsos negativos <sup>91</sup>. Estas reacciones se prepararon independientemente y luego fueron procesadas con el mismo protocolo de amplificación utilizado para el biomarcador ADNk.

### **5.13 Análisis de los resultados**

#### **5.13.1 Análisis de los ensayos de optimización de la PCR de punto final dirigido al ADNk**

El par 1 y el par 2 de cebadores amplifican una región conservada del ADNk del minicírculo que genera productos de 116 pb y 138 pb, respectivamente. La verificación y visualización de la amplificación de los productos de PCR esperados se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 3%. Para la electroforesis horizontal se empleó la cámara *Cleaver Scientific Ltd.* y el buffer de electroforesis Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. La corrida electroforética se realizó a 70 V por 60-70 minutos. Los geles se tiñeron con una preparación de SYBR Gold 1X y las imágenes fueron tomadas utilizando un equipo documentador de geles. Se incluyó en cada gel un carril

de marcador de ADN de 100 pb GeneRuler de la marca *Thermo Scientific*. Se evaluó de forma cualitativa la presencia de la banda del tamaño esperado y se validó cada ensayo en base al correcto funcionamiento de los controles positivos y negativos del sistema.

### **5.13.2 Análisis de los ensayos de optimización, sensibilidad y especificidad analítica del ensayo PCR/CRISPR-ADNk**

Con la data de fluorescencia colectada en los ensayos basados en Cas12a se construyeron las gráficas de la cinética de la reacción CRISPR en el tiempo (señal de fluorescencia medida en RFU vs. el tiempo en minutos). Las muestras cuya señal se incrementa considerablemente en el tiempo respecto a la señal generada por los controles negativos (señal basal por debajo de los 9000 RFU) son consideradas como detectadas por el sistema. En el caso de que la muestra problema genere una señal similar a la del control negativo NTC1-PCR se considera como no detectada <sup>70</sup>.

Luego, los datos de fluorescencia obtenidos en cada ensayo fueron normalizados dividiendo los valores RFU de la muestra entre los RFU del control NTC-PCR, lo que resultó en una razón de fluorescencia. En los ensayos de optimización, la razón de fluorescencia  $> 2$  se consideró como señal diferencial <sup>75</sup>.

En el caso del ensayo de especificidad analítica los valores de la razón de fluorescencia obtenidos a partir de las muestras y controles se analizaron estadísticamente utilizando una prueba t para datos no pareados. Las

diferencias con  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas (solo en los casos donde se realizó 3 repeticiones a más). Finalmente se tomaron dos tiempos de punto de corte de 20 y 40 minutos de la reacción Cas12a. Las gráficas se realizaron usando el programa GraphPad Prism versión 9.3 disponible en [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

### 5.13.3 Análisis de las muestras clínicas

#### - Ensayos de cPCR-ADNk de diagnóstico y qPCR-ADNk para detección y cuantificación (estimación de carga parasitaria) de *Leishmania spp.*

Los siguientes ensayos estuvieron a cargo de investigadores del Laboratorio de Patho-antígenos, LID-UPCH. La cPCR dúplex empleada en la confirmación diagnóstica de LC se basó en la amplificación de una región de 70 pb del minicírculo del ADNk (utilizando los cebadores MP1L-MP3H específicos del subgénero *Viannia*) y una región del gen humano codificante de la  $\beta$ -globina de 107 pb como control interno. La cPCR se basó en el protocolo de López *et al.* (1993)<sup>84</sup> y consta de 40 ciclos de amplificación. Los resultados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 3% para la visualización de los productos de la PCR. Las muestras procesadas que generaron bandas del tamaño esperado fueron consideradas como positivas y la ausencia del producto de la PCR como negativas. Todas las muestras amplificaron el control humano.

El ensayo de qPCR dirigido al ADNk utiliza el mismo par de cebadores MP1L-MP3H específicos del subgénero *L. (Viannia)*<sup>48</sup>. Los valores de Cq

(ciclo de cuantificación) junto con la estimación de la carga parasitaria fueron brindados para los análisis de los resultados de las distintas pruebas moleculares realizadas en las muestras clínicas. La carga parasitaria de *Leishmania* se calculó de la siguiente manera: [(equivalentes de ADN del parásito/reacción estimados por qPCR-ADNk)/(número de copias promedio del gen humano *ERV-3 /2*)] x 10<sup>6</sup>, expresado como el número de parásitos de *Leishmania* por 10<sup>6</sup> células humanas.

#### **- Análisis de los resultados de muestras clínicas procesadas por la prueba PCR/CRISPR-ADNk**

Los ensayos CRISPR-Cas12a brindan resultados cualitativos (ésto es, diana detectada o no detectada). Los siguientes análisis nos permitieron clasificar las muestras clínicas con resultado positivo o negativo de detección de ADN de *Leishmania*.

##### (i) Análisis basado en el valor de la razón de fluorescencia (data normalizada)

La clasificación de muestras con resultado positivo o negativo de detección de ADN de *Leishmania* se determinó con el punto de corte en base al criterio de “media de los valores de la razón de fluorescencia de muestras negativas más 3 desviaciones estándar”. Para este análisis se consideraron las muestras clasificadas como negativas a partir de los resultados de la prueba de referencia, la qPCR. En estas muestras negativas no se registraron valores de Cq.

Para el cálculo de la razón de fluorescencia se procedió como sigue:

- a. Se extrajo la data cruda de fluorescencia (RFU) del archivo Excel previamente exportado (utilizando el software del equipo lector de fluorescencia) y guardado.
- b. Se dividieron los valores de RFU de la muestra problema entre los valores de RFU del control NTC-PCR, empleando la siguiente fórmula general:

$$\frac{=}{=}$$

- c. Se consideraron los valores de RFU del punto de tiempo de lectura de la reacción Cas12a establecido para cada diana genética: 20 min para ADNk y 10 min para el control humano ARNasa P.

En el caso de los resultados obtenidos de la prueba PCR/CRISPR dirigido al biomarcador ARNasa P (control humano), se tomó como punto de corte (para considerar una muestra positiva a detección de ese gen) una señal de fluorescencia 5 veces por encima de la señal de fondo (ésto es, un valor de la razón de fluorescencia  $> 5$ ), según lo reportado por Khan *et al.* (2021) <sup>92</sup>.

(ii) Análisis basado en la data de fluorescencia (RFU): Porcentaje de positividad (PP)

Se consideró el análisis complementario del porcentaje de positividad (PP) para la elección del punto de corte de clasificación de muestras. Este análisis controla la variabilidad entre placas, lo que permite una adecuada comparación entre distintas placas de procesamiento de muestras<sup>93,94</sup>. Este análisis se realizó con software estadístico (Stata MP versión 17 y GraphPad Prism versión 9) y comprendió los siguientes pasos, según lo reportado por Zimic *et al.* (2009)<sup>94</sup>:

- El cálculo de  $PP = [\text{señal fluorescente (RFU) de cada muestra} / \text{RFU del control positivo incluido en la placa de ensayo respectiva}] \times 100$ ;
- Empleando la data de PP como variable predictora y la data (valor Cq) de las reacciones qPCR-ADNk como clasificador binario del estatus de infección por *Leishmania* en las muestras clínicas (0 = no detectado; 1 = detectado), se realizó una regresión logística simple;
- Paso seguido, se realizó el análisis de la curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) en el rango de puntos de corte para la variable predictora (PP). Se seleccionó el punto de corte de probabilidad óptimo para la clasificación (Pr-cutoff/PP) que maximice el índice de Youden (sensibilidad + especificidad – 1).

#### 5.13.4 Análisis estadístico

En la evaluación de la especificidad analítica de los grupos de especies del subgénero *Viannia*, subgénero *Leishmania* y controles del sistema, se utilizó la prueba t para datos no pareados. Las diferencias con  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas. Comparaciones por pares de los datos de la razón de fluorescencia de las reacciones de Cas12a se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 9.3.

En la evaluación del desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en muestras clínicas en comparación con la qPCR (prueba de referencia) se empleó un tamaño muestral de 49 muestras que contaban con estatus de infección por *Leishmania* confirmado por la prueba cPCR-ADNk<sup>84</sup> usada en la rutina diagnóstica (36 muestras positivas y 13 muestras negativas). Teniendo en cuenta este panel relativamente pequeño de muestras (principalmente de muestras con resultado PCR negativo), en el presente estudio no se evaluó la exactitud diagnóstica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en términos de sensibilidad y especificidad diagnóstica. Se determinó el desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk vs. qPCR-ADNk (data de Cq) mediante el cálculo del porcentaje de concordancia positiva (PPA) y porcentaje de concordancia negativa (NPA) entre los resultados de ambas pruebas. Se empleó el software Analyse-it para Microsoft Excel (<https://analyse-it.com/>) en los análisis de concordancia con la prueba de referencia; el cálculo de los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para PPA y NPA se basó en el test de puntuación (*score*) de Wilson, el cual es un método para estimar la probabilidad de la población a

partir de una probabilidad muestral cuando la probabilidad sigue la distribución binomial <sup>95</sup>. Además, se calculó el índice Kappa de Cohen y los IC 95% para kappa manualmente como lo describe McHugh *et al.* (2012) <sup>96</sup>.

## VI. Resultados

### 6.1 Producción del crARN-ADNk

Se obtuvo 10 alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  cada una de crARN-ADNk purificado de una concentración promedio  $\pm$  desviación estándar de  $36.567 \pm 2.351 \mu\text{M}$ . Se muestran los datos obtenidos de la cuantificación y cálculo de la concentración molar (Tabla 2). En el caso del crARN-ARNasa P se trabajó con una alícuota de crARN de una concentración de  $15.09 \mu\text{M}$  (fue provista por los investigadores de un proyecto del grupo de investigación de UPC).

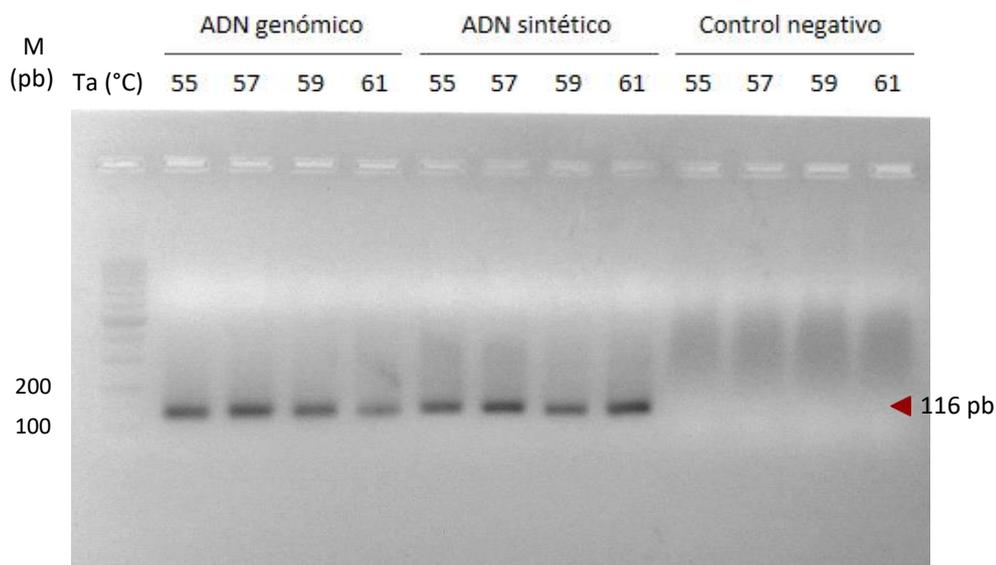
**Tabla 2.** Cuantificación y cálculo de la concentración del crARN-ADNk

<b>Muestra</b>	<b>[Diluido] (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[Final] (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[Final] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
ADNk 1/10 S1	48.10	481.00	38.68
ADNk 1/10 S2	44.90	449.00	36.11
ADNk 1/10 S3	41.60	416.00	33.46
ADNk 1/10 S1	48.30	483.00	38.85
ADNk 1/10 S2	47.80	478.00	38.44
ADNk 1/10 S3	42.10	421.00	33.86
ADNk 1/10 S1	48.20	482.00	38.77
ADNk 1/10 S2	46.35	463.50	37.28
ADNk 1/10 S3	41.85	418.50	33.66
		Promedio $\pm$ DE	$36.57 \pm 2.35$

### 6.2 Curva de temperatura de hibridación de los cebadores

La temperatura de hibridación ( $T_a$ , temperatura de *annealing*) se optimizó en un termociclador de gradiente aumentando la temperatura en pasos de  $2^\circ\text{C}$ . La evaluación con el par 1 de cebadores del ADNk con los respectivos controles se muestra en la Figura 8. En los carriles 2-5 se muestran las bandas generadas a partir de las diferentes  $T_a$  de  $55^\circ\text{C}$ ,  $57^\circ\text{C}$ ,  $59^\circ\text{C}$  y  $61^\circ\text{C}$  cuando se agregó ADNg de

*Leishmania* a la reacción de la PCR. Se obtuvo que las temperaturas de *annealing* óptimas fueron de 59°C y 61°C, ambas permitieron la generación de bandas únicas, de un tamaño de 116 pb. La *Ta* de 59°C mostró una banda más intensa. En los carriles 6-9 se muestran las bandas del control positivo ADN sintético de *Leishmania*. Los controles negativos (NTC) ubicados en los carriles 10-13 no produjeron ningún producto, confirmando así que se realizó una PCR libre de contaminación. Los resultados con el par 2 de cebadores del ADNk fueron similares (resultados no mostrados). Se escogió trabajar en adelante con la *Ta* de 61°C.



**Figura 8.** Curva de temperatura de *annealing* para el par 1 de cebadores del ADNk. Se visualiza los productos de la PCR de la amplificación del biomarcador ADNk, con el par 1 de cebadores (116 pb) a diferentes *Ta*. Gel de agarosa al 3%. Corrida electroforética a 70V por 60 min. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb.

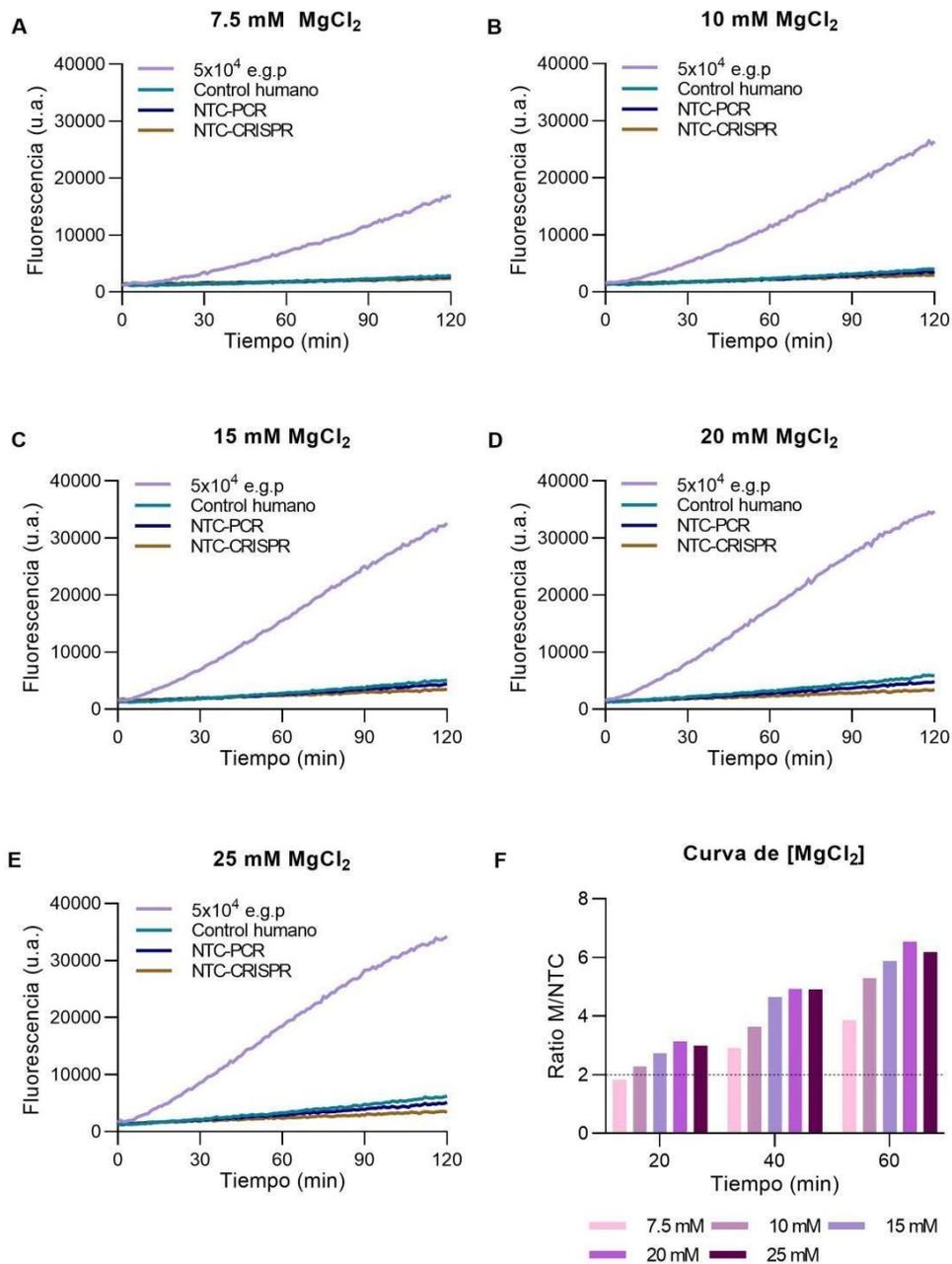


#### 6.4 Curva de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) en la reacción CRISPR-Cas12a

Se realizó la distinción cualitativa de la señal y la razón de fluorescencia (>2 considerado como señal diferencial) <sup>75</sup> generada en el tiempo de la reacción de Cas12a por las diferentes concentraciones del ión magnesio evaluadas.

Los resultados del ensayo CRISPR empleando los controles pre-amplificados con el par 1 de cebadores del ADNk fueron los siguientes: las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 7.5 y 10 mM produjeron que los controles positivos (reacción de la PCR donde se agregó ADN de *Leishmania* como molde) alcancen una señal <27 000 RFU luego de 120 minutos de lectura, mientras que los controles negativos (control humano, NTC-PCR y NTC-CRISPR) se mantuvieron por debajo de 4000 RFU en ese mismo periodo de tiempo (Figuras 10A y 10B). Las otras tres concentraciones de MgCl<sub>2</sub> generaron señales <32 000 RFU y los controles negativos se mantuvieron hasta por debajo de 6300 RFU (Figuras 10C-E).

Si se considera como punto de tiempo de evaluación a los 20 minutos de la reacción CRISPR para las dos concentraciones más bajas de magnesio, los valores de la razón de fluorescencia fueron <2.5; y en el caso de las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 15, 20 y 25 mM los valores de la razón de fluorescencia alcanzada fueron de 2.74, 3.13 y 2.99, respectivamente. Luego, las evaluaciones a los 40 min y 60 min de la reacción de Cas12a mostraron una tendencia similar (Figura 10F).

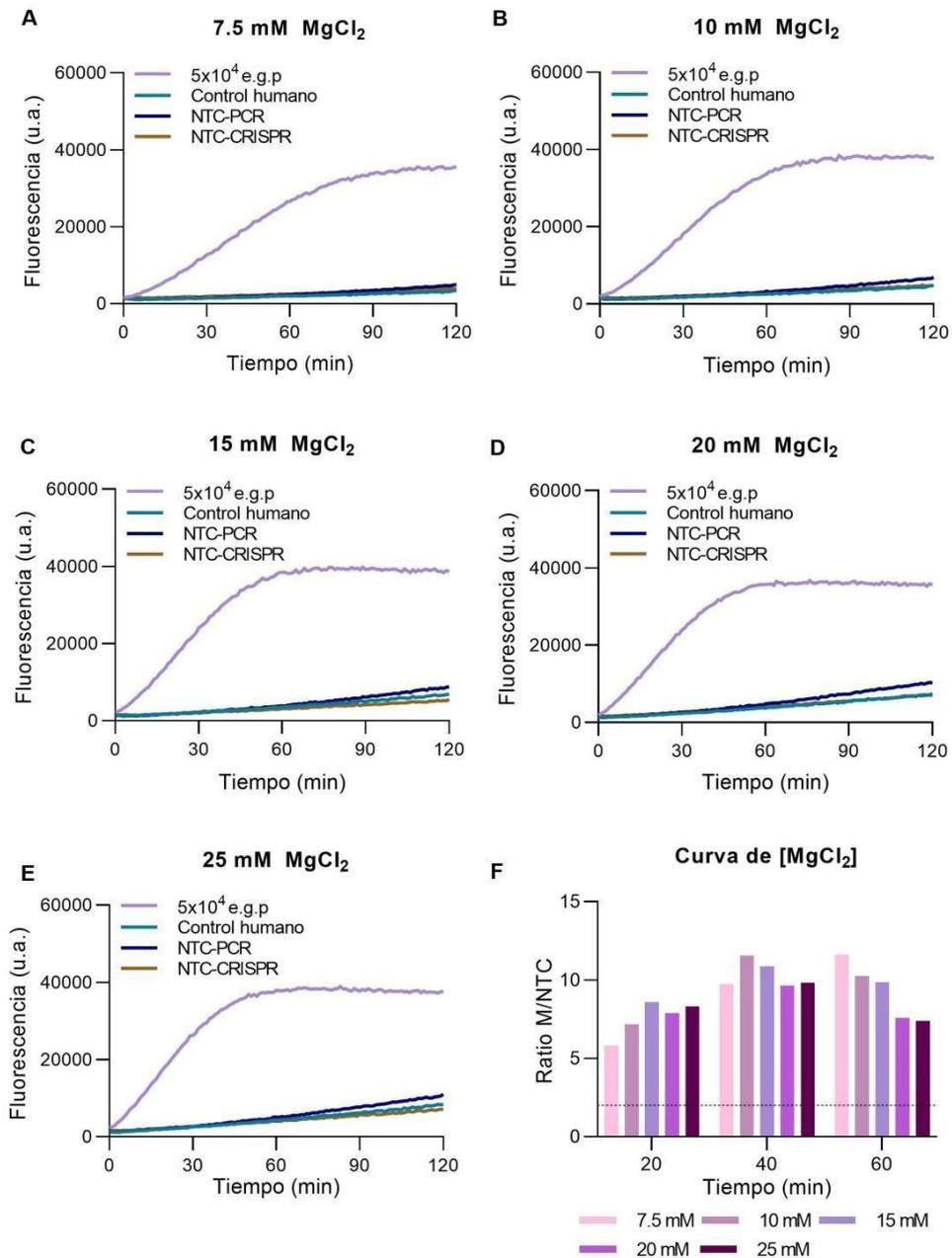


**Figura 10.** Curva de concentración de magnesio en la reacción CRISPR-Cas12a empleando el par 1 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación. Abreviaturas: u.a., unidades arbitrarias; razón M/NTC: valor de la razón de la señal de fluorescencia de la muestra problema/fluorescencia del control NTC-PCR. Control positivo: ADNg de *L. braziliensis* M2904 ( $5 \times 10^4$  equivalentes genómicos de parásitos).

En el caso de la pre-amplificación con el par 2 de cebadores la señal del control positivo en las reacciones de Cas12a empleando las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 7.5 y 10 mM fue >38 000 RFU mientras que los controles negativos alcanzaron valores por debajo de 6900 RFU (Figuras 11A y 11B). En las otras tres concentraciones de magnesio de 15, 20 y 25 mM, los controles negativos mostraron una señal menor a 8800, 10200 y 11100 RFU en cada caso (Figuras 11C-E). Cuando se realizó la evaluación a los 20 minutos de la reacción CRISPR, los valores de la razón de fluorescencia más altos en el control positivo fueron de 8.59, 7.87 y 8.33 para las concentraciones de 15, 20 y 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, respectivamente.

Luego, a los 40 minutos de la reacción se observó una tendencia similar; sin embargo, a los 60 minutos las concentraciones más bajas de MgCl<sub>2</sub> resultaron en valores de la razón de fluorescencia más altos (Figura 11F).

El aumento en la señal de fluorescencia en la reacción de Cas12a fue directamente proporcional al incremento de la concentración de magnesio para el caso de los controles positivos pre-amplificados con el par 1 de cebadores. Mientras que en los controles positivos pre-amplificados con el par 2 de cebadores la señal de fluorescencia en la reacción de Cas12a se saturó tempranamente. La diferencia observada fue que las concentraciones de 20 mM y 15 mM de MgCl<sub>2</sub> generaron los valores de la razón de fluorescencia más altos a los 20 min de la reacción de Cas12a cuando se empleó el par 1 y par 2 de cebadores del ADNk, respectivamente (Figuras 10F y 11F). Finalmente se seleccionó la concentración de 15 mM de MgCl<sub>2</sub> para los análisis posteriores.



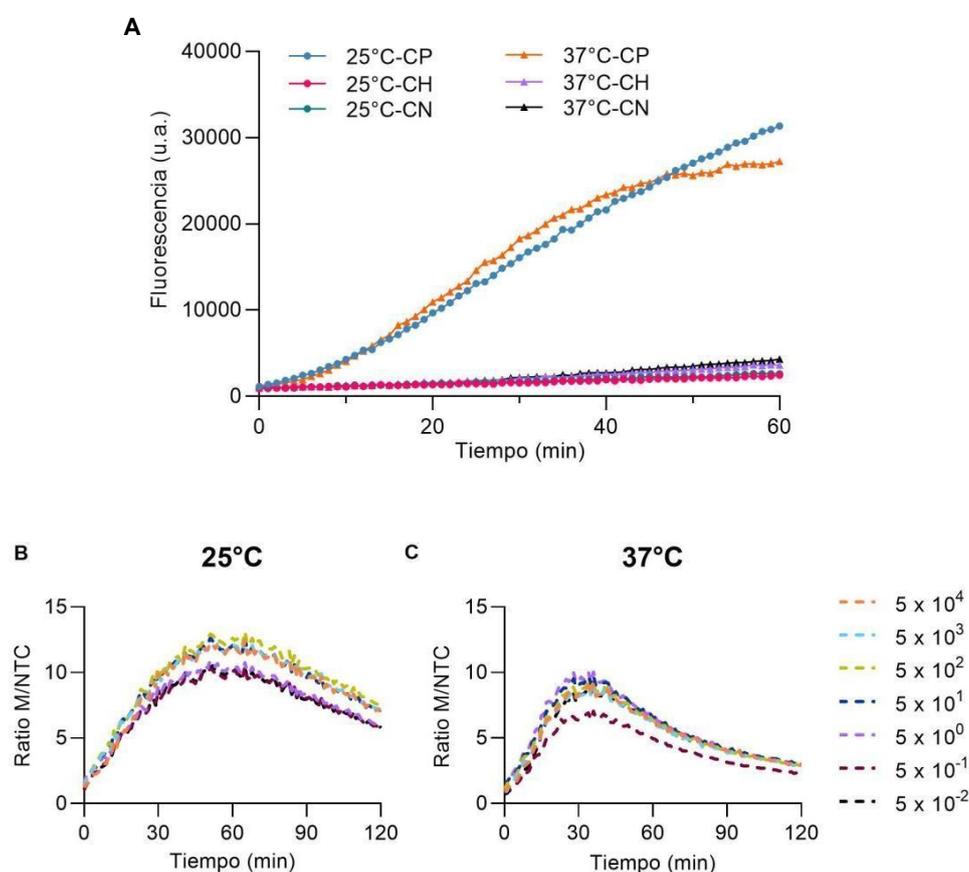
**Figure 11.** Curva de concentración de magnesio en la reacción CRISPR-Cas12a empleando el par 2 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación. Control positivo es ADNg de *L. braziliensis* M2904 ( $5 \times 10^4$  equivalentes genómicos de parásitos). Abreviaturas: u.a., unidades arbitrarias; razón M/NTC, razón de fluorescencia de la muestra/fluorescencia del control NTC-PCR.

## 6.5 Evaluación de la temperatura de reacción de la enzima Cas12a

La evaluación de los controles en la prueba PCR/CRISPR-ADNk (con el par 2 de cebadores del ADNk) mostró que a una temperatura de 25°C se promueve una mayor señal de fluorescencia en el control positivo (38377 RFU) respecto a la reacción que se llevó a cabo a 37°C (26704 RFU) luego de 120 minutos de reacción. Estos resultados son correspondientes a un experimento realizado por cada temperatura de reacción evaluada. La señal no específica *background* del control humano y control NTC-PCR en la reacción CRISPR a 25°C fue de 4145 y 5380 RFU en cada caso, mientras que en la reacción CRISPR a 37°C la señal del control humano fue de 7610 RFU y la del NTC-CRISPR fue de 9262 RFU en 120 minutos de reacción. Esto último es cerca del 70% más señal respecto a la obtenida a 25°C. Estos resultados fueron obtenidos de una repetición del ensayo por cada temperatura evaluada. (Figura 12A).

Los valores de la razón de fluorescencia obtenidos en el punto más alto de la curva estándar de ADN de *Leishmania* (señal específica) para el primer caso (25°C) fue de alrededor de 6.66 a los 20 minutos de reacción (Figura 12B) siendo ligeramente menor en comparación con la segunda temperatura evaluada (37°C), en la cual se registró un valor de razón de 7.04. Como se observa en la Figura 12C, cuando se realizó la lectura a 37°C, a los 60 minutos de la reacción, el sistema se saturó; esto produce que los valores de la razón de fluorescencia se reduzcan considerablemente llegando a 2.9 luego de 120 minutos. Además, los valores de la razón de fluorescencia muestran que la sensibilidad de detección no se ve afectada por el cambio de temperatura, dado que en ambos casos se detectó  $5 \times 10^{-2}$  equivalentes

genómicos de parásitos. Con la finalidad de una adaptación futura del sistema de detección CRISPR a un formato POC (pruebas en el punto de atención), se decidió trabajar con una temperatura de reacción de 25°C (temperatura ambiente). Se realizaron las mismas evaluaciones con el par 1 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación, obteniéndose resultados similares en la reacción CRISPR (no mostrados).



**Figura 12.** Curva de temperatura de la reacción CRISPR.

(A) Gráfica de señal de fluorescencia vs tiempo de los controles positivos (CP), controles negativos (CN) y control humano (CH) utilizados en la prueba PCR/CRISPR-ADNk (en este caso se utilizó el par 2 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación) evaluados con incubación de la reacción de Cas12a a dos distintas temperaturas.

(B-C) Gráfica de los valores de razón de fluorescencia vs tiempo de la curva de ADN g de *Leishmania braziliensis* cepa M2904 (que abarca una dilución seriada de 7 log) obtenida de la evaluación con la prueba PCR/CRISPR-ADNk (se empleó el par 2 de cebadores en la PCR).

## 6.6 Ensayo de sensibilidad analítica

Se evaluaron diluciones seriadas de ADN genómico correspondiente a  $5 \times 10^4$  –  $5 \times 10^{-3}$  equivalentes genómicos de parásitos de *Leishmania braziliensis* M2904. Sobre la base de las curvas de señal y los valores de la razón de fluorescencia (data normalizada) de los ensayos PCR/CRISPR-Cas12a realizados por triplicado de manera independiente, se determinó que la cantidad de ADN *input* mínima detectada por la prueba PCR/CRISPR-ADNk, donde se evaluó el par 1 y par 2 de cebadores en el proceso de pre-amplificación de la diana, fue de  $5 \times 10^{-2}$  equivalentes genómicos de parásitos por reacción (Figura 13), correspondiente a 4.25 fg de ADN genómico de *L. braziliensis*. Cabe resaltar que en una de las 3 pruebas PCR/CRISPR-ADNk realizados con el par 2 de cebadores en el paso de pre-amplificación se logró detectar hasta  $5 \times 10^{-3}$  equivalentes genómicos de parásitos ó 0.425 fg de ADN por reacción.

En las Figuras 13A y 13D se muestran las curvas de fluorescencia (cinética de la reacción CRISPR) de un experimento representativo realizado con cada par de cebadores para el biomarcador ADNk. Con el par 2 de cebadores se observó que el sistema se saturó a los 60 minutos de la reacción mientras que con el par 1 demoró 20 minutos más en alcanzar esta condición. Los controles negativos generaron una señal no específica <10 000 RFU en 120 minutos de reacción en ambos casos.

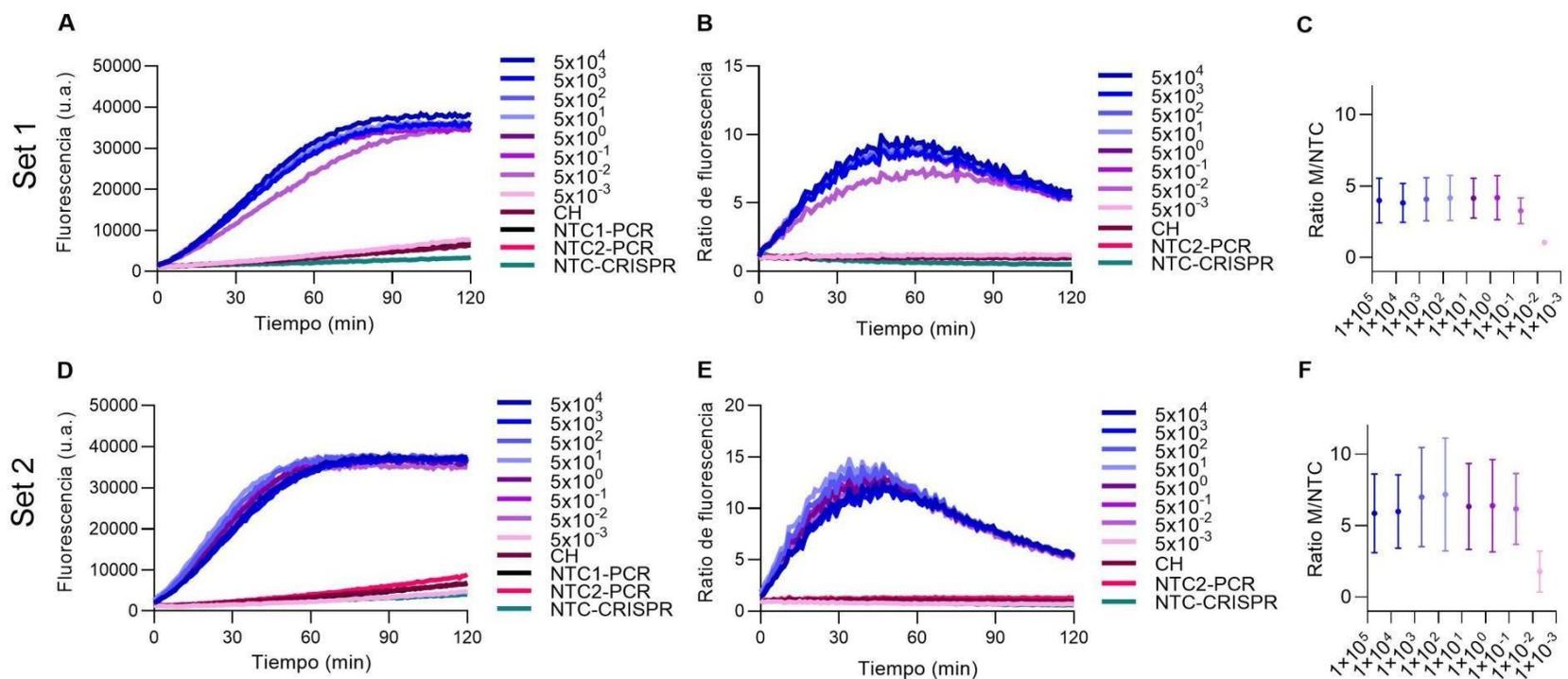
En las Figuras 13B y 13E, los valores de razón de fluorescencia (data normalizada) más altos alcanzados con el primer punto de la curva estándar ( $5 \times 10^4$  e.g.p) se produjeron cuando la pre-amplificación de la diana se realizó con el par 2 de cebadores; aquellos valores de razón de fluorescencia fueron 3 veces más altos (a los 50 minutos de la reacción CRISPR) respecto a los alcanzados cuando la pre-amplificación de la diana ADNk se realizó con el par 1 de cebadores. En este punto de tiempo (50 min) de la reacción, se observa que hay una diferencia de hasta 5 veces, a nivel de los valores de razón de fluorescencia, entre el control positivo y el control negativo humano (CH) así como el control NTC.

Los valores de la razón de fluorescencia en el punto de corte de 20 minutos cuando la pre-amplificación de la diana ADNk se realizó con el par 2 de cebadores fueron  $>5$  (Figura 13C) pero se encontró una dispersión mayor entre los valores de las 3 repeticiones respecto a la media. En el caso de la pre-amplificación de la diana ADNk con el par 1 de cebadores los valores de la razón de fluorescencia fueron  $<5$  pero en contraste con los ensayos realizados con el par 2 de cebadores se produjo una dispersión menor de los datos (Figura 13F). Además, el punto de dilución más bajo detectado ( $5 \times 10^{-2}$  e.g.p) a partir de ADN genómico de *L. braziliensis* M2904, obtenido con el par 1 de cebadores, alcanzó un valor de razón de fluorescencia que fue en promedio  $3.262 \pm 0.91$ , mientras que para el par 2 de cebadores los valores de razón de fluorescencia fueron de  $6.171 \pm 2.48$  (Figuras 13C y 13F).

Los datos de fluorescencia normalizada (ésto es, el valor de la razón de fluorescencia) no mostraron relación directa proporcional con la cantidad de ADN de *Leishmania*

colocada en cada reacción. Esto se debe a que en la PCR de punto final (paso de pre-amplificación utilizado) la reacción llega al *plateau* y, por ende, no se produce una relación directa entre cantidad de ADN *input* y los valores de razón de fluorescencia.

La sensibilidad analítica observada en las pruebas de PCR/CRISPR-ADNk fue similar al desempeño de la prueba de referencia qPCR-ADNk para la detección de ADN de *Leishmania*; se reportó que esta última puede detectar hasta  $5 \times 10^{-3}$  e.g.p<sup>48</sup>. Esto a pesar de utilizar diferentes pares de cebadores dirigidos a la región conservada del ADNk en especies de *L. (Viannia)*. Este factor podría haber modificado la sensibilidad del sistema, pero dada la naturaleza multicopia del biomarcador ADNk, la sensibilidad de detección no se vio afectada.



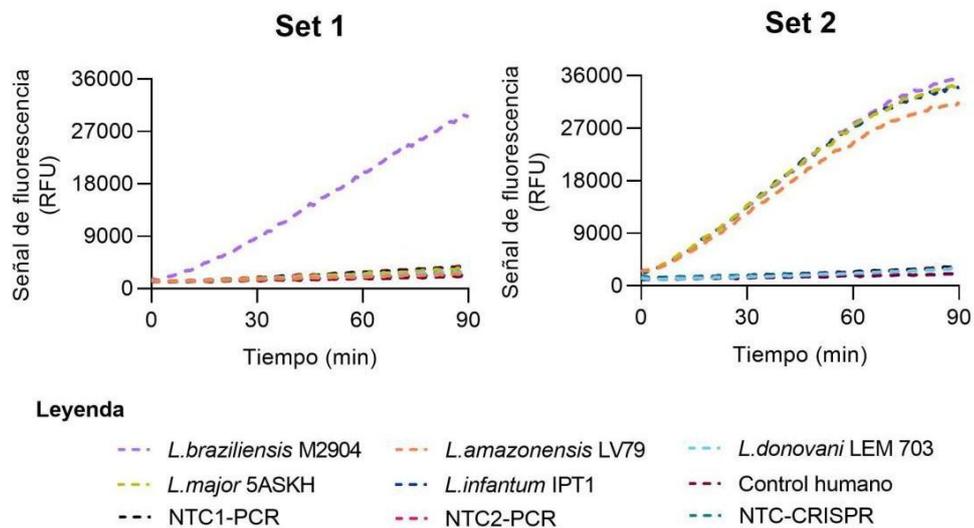
**Figura 13.** Ensayo de sensibilidad analítica con dos pares de cebadores para el biomarcador ADNk.

Gráficas de la señal y ratio de fluorescencia vs tiempo (120 minutos) de la reacción CRISPR, empleando el par 1 (A-B) o par 2 (D-E) de cebadores en el paso de pre-amplificación de la diana ADNk. Los gráficos C y F muestran los ratios de fluorescencia a los 20 minutos de la reacción CRISPR para la curva de equivalentes genómicos de parásitos pre-amplificados con el par 1 y par 2 de cebadores, respectivamente; los valores del eje X se encuentran en escala logarítmica (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). u.a: unidades arbitrarias. CH, control humano. NTC-PCR y NTC-CRISPR, controles negativos (mix de la reacción sin ADN) de los ensayos de PCR y CRISPR, respectivamente.

## 6.7 Ensayo de especificidad analítica

El ensayo de especificidad con el sistema CRISPR reveló que sólo con el par 1 de cebadores utilizado en la pre-amplificación del ADNk diana en combinación con el crARN-ADNk diseñado se logró discriminar a *Leishmania (Viannia) braziliensis* en un grupo de 5 cepas de referencia, 4 de ellas pertenecientes a especies del subgénero *L. (Leishmania)*. En el punto de tiempo 90 minutos de la reacción de Cas12a, la señal de fluorescencia acumulada de la cepa *L.(V.) braziliensis* M2904 fue cerca de 10 veces mayor que lo obtenido con las cepas del subgénero *L. (Leishmania)* evaluadas. En el punto de tiempo 20 minutos de la reacción la diferencia fue de 3.5 veces (Figura 14, panel de la izquierda).

A diferencia del par 2 de cebadores que generó un amplicón que produjo en la reacción CRISPR el reconocimiento de la cepa de referencia de *L. braziliensis* perteneciente al subgénero *L. (Viannia)* así como de 3 cepas pertenecientes a especies del subgénero *L. (Leishmania)* (sólo *L. donovani* no fue detectada); todas ellas produjeron valores de RFU con incremento similar en el tiempo de la reacción de Cas12a (Figura 14, panel de la derecha). Los controles con ADNg humano y controles negativos estuvieron por debajo de 4000 RFU al final del tiempo de lectura en ambos casos (Figura 14). Se realizaron dos experimentos de manera independiente, se muestra los resultados de un experimento.

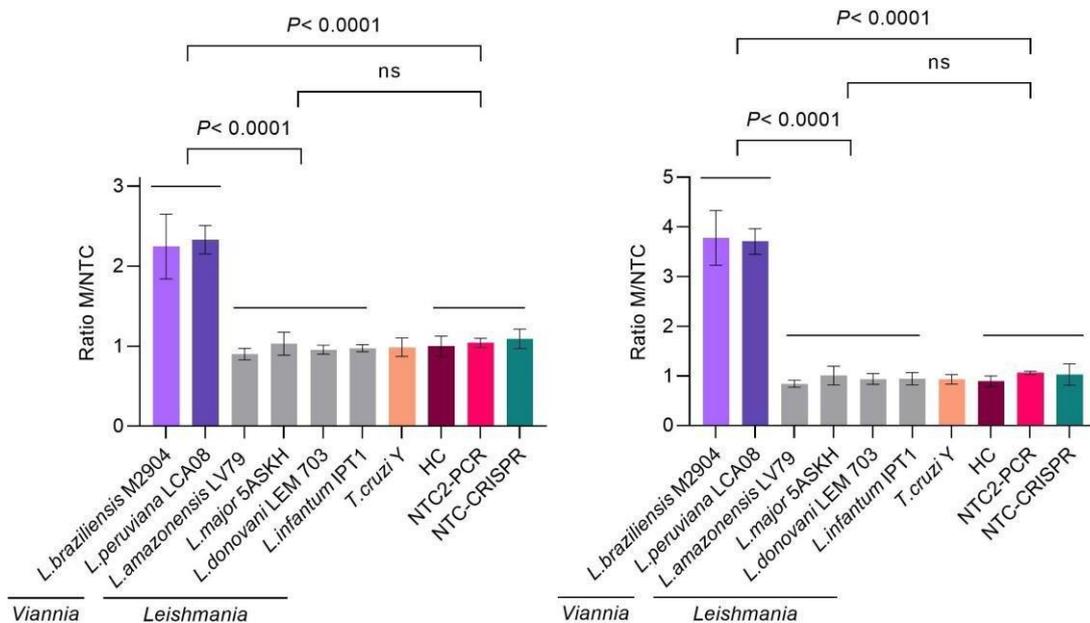


**Figura 14.** Evaluación de la especificidad analítica de dos pares de cebadores para el biomarcador ADNk.

La selección del par 1 de cebadores se debió a la especificidad por *L. (Viannia)* respecto al par 2 de cebadores que mostró ser específico a nivel del género *Leishmania*. Una vez seleccionado el par de cebadores de ADNk óptimo para la amplificación, se evaluó una cepa adicional del subgénero *L. (Viannia)*, *L.(V.) peruviana* LCA08, y se incluyó la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Se muestran los resultados de 4 experimentos de la prueba de PCR/CRISPR-ADNk independientes (Figura 15). La lectura de la señal fluorescente de la reacción de Cas12a fue realizada en dos equipos lectores de fluorescencia en placa: Synergy H1 y Cytation 5 (BioTek Instruments). Se encontró una diferencia de hasta 10 veces entre los valores de razón de fluorescencia de cepas pertenecientes al subgénero *L. (Viannia)* y cepas del subgénero *L. (Leishmania)* en el punto de tiempo 120 min de reacción. Las cepas representativas de especies de *L. (Viannia)* generaron en promedio ( $\pm$  desviación estándar) un valor de razón de fluorescencia de  $2.287 \pm 0.290$  (rango,

1.879 – 2.817) en comparación al valor de  $0.967 \pm 0.080$  (0.827 - 1.229) del grupo de cepas del subgénero *L. (Leishmania)* a los 20 minutos de la reacción CRISPR, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). El valor de la razón de fluorescencia alrededor de 1 obtenido en el grupo de los controles (control humano, NTC2-PCR y NTC-CRISPR) difirió significativamente ( $p < 0.0001$ ) de los valores de la razón de fluorescencia de las cepas representativas de *L. (Viannia)*. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre los controles negativos y el grupo de cepas de *L. (Leishmania)*. No hubo reacción cruzada con la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, en este caso se obtuvo un valor de la razón de fluorescencia de  $0.987 \pm 0.116$  (rango, 0.892 – 1.148) (Figura 15, panel de la izquierda).

En el caso del análisis a los 40 minutos de la reacción de Cas12a, los valores de la razón de fluorescencia obtenidos para las 2 especies representativas del subgénero *L. (Viannia)* fueron  $3.744 \pm 0.399$  (rango, 3.359 – 4.589), mientras que los valores de la razón de fluorescencia que generaron las reacciones que se llevaron a cabo con las especies del subgénero *L. (Leishmania)* fueron  $0.932 \pm 0.132$  (rango, 0.766 – 1.285). Además, al igual que en la reacción evaluada a los 20 minutos, los valores de la razón de fluorescencia de los controles ( $0.993 \pm 0.148$ ; rango, 0.709 - 1.159) y de la cepa Y de *T. cruzi* ( $0.929 \pm 0.095$ ; rango, 0.804 – 1.037) se mantuvieron  $< 1$  (Figura 15, panel de la derecha).



**Figura 15.** Evaluación de la especificidad analítica de la prueba PCR/CRISPR-ADNk. Gráfica de barras que muestra el valor de la razón de fluorescencia de cepas de referencia pertenecientes al subgénero *Viannia* o *Leishmania* evaluadas en los tiempos de lectura de 20 minutos (panel izquierdo) y 40 minutos (panel derecho). La data mostrada representa la media  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes. Se empleó el par 1 de cebadores en la pre-amplificación del ADN diana.

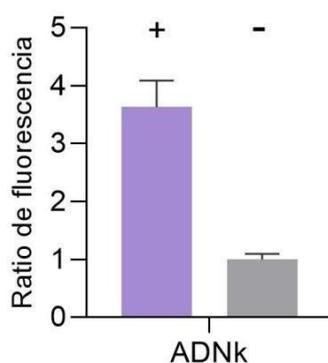
## 6.8 Muestras clínicas

Las muestras de ADN genómico obtenidas de lesiones cutáneas de pacientes fueron diluidas 1:9 en un volumen final de 20  $\mu$ L y cuantificadas en el espectrofotómetro Nanodrop. Las concentraciones de ADN registradas se encontraron en un amplio rango de 1.9 - 42.8 ng/ $\mu$ L. La relación A260/A280, en el 75% de las muestras, dio valores superiores a 1.53 hasta 2.20, indicativo de ADN de pureza aceptable-óptima.

*-Control de calidad de los controles positivos y negativos*

Con la finalidad de establecer que los resultados de las muestras clínicas sean válidos y no se produjeron contaminaciones durante el procesamiento, se analizó la data colectada en las pruebas de PCR/CRISPR-ADNk para los controles positivos y negativos examinados en paralelo a las muestras clínicas (n=6 experimentos independientes). Se calculó la media de la señal de fluorescencia (n=6) a los 20 minutos de la reacción de Cas12a para el control NTC1-PCR; dicho valor (media=1.00) se utilizó para normalizar los datos de fluorescencia de los demás controles (positivo, humano, NTC2-PCR y NTC-CRISPR).

Luego se compararon las diferencias de los valores de la media más la desviación estándar de los valores de la razón de fluorescencia de los controles; se observó una diferencia de alrededor de 3 veces entre el control positivo ( $3.631 \pm 0.457$ ) y el NTC1-PCR ( $1.000 \pm 0.094$ ) (Figura 16).



**Figura 16.** Diferencia entre los valores de la razón de fluorescencia de los controles positivos y negativos a los 20 minutos de la reacción CRISPR-Cas12a. La data mostrada representa la media de los valores de la razón de fluorescencia  $\pm$  DE (n = 6).

- *Evaluación del desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en muestras clínicas*

Los datos obtenidos en la evaluación del panel de 49 muestras clínicas con el ensayo de PCR/CRISPR dirigido al biomarcador ADNk de *Leishmania* se analizaron con dos criterios de puntos de corte para la clasificación de muestras con resultado positivo o negativo a detección de *Leishmania* (sección 5.13.3), obteniéndose lo siguiente:

(i) Basado en los valores de la razón de fluorescencia

En primer lugar, se consideró el criterio “media de los valores de la razón de fluorescencia de muestras negativas + 3 desviaciones estándar ( $\bar{x} + 3DE$ )”. Se identificaron 10 muestras negativas por el ensayo de qPCR-ADNk. Se realizaron los cálculos respectivos con la data de la prueba PCR/CRISPR-ADNk y se obtuvo una  $\bar{x} + 3DE$  de  $0.942 + 0.069$ , luego se determinó el valor de punto de corte  $\bar{x} + 3DE = 0.942 + 0.208 = 1.151$  (Tabla 3).

Luego, el valor de la razón de fluorescencia (data normalizada) para cada muestra fue contrastado con el valor del punto de corte y se clasificó como resultado positivo de detección de ADN de *Leishmania* a aquellas muestras con un valor de razón de fluorescencia mayor a 1.151. Por otro lado, valores menores o iguales a este punto de corte se clasificaron como negativos (Figura 17).

**Tabla 3.** Determinación del punto de corte basado en  $\bar{X} + 3DE$  para el biomarcador ADNk

Código de muestra	Tipo de muestra	qPCR-ADNk	PCR/CRISPR-ADNk	
		Valor de Cq	Valor de la señal de fluorescencia (RFU)	Valor de la razón de fluorescencia
CL-01	papel filtro	N/A	1722	1.010
CL-02	papel filtro	N/A (2)*	1351 (1552)	0.792 (0.910)
CL-07	hisopo	N/A	1715	1.006
CL-17	citocepillo	N/A (2)*	1589	0.932
CL-18	biopsia	N/A (2)*	1567	0.919
CL-19	citocepillo	N/A	1602	0.940
CL-21	biopsia	N/A	1615	0.947
CL-22	biopsia	N/A	1516	0.889
CL-29	hisopo	N/A	1792	1.051
CL-32	biopsia	N/A	1654	0.970
			Media	0.942
			DE	0.069
			3DE	0.208
			Media + 3DE	1.151

La data mostrada corresponde a 10 muestras negativas por qPCR-ADNk y PCR/CRISPR-ADNk.

\*Los valores en paréntesis representan el número de repeticiones del ensayo realizado para las muestras CL-02, CL-17 y CL-18.

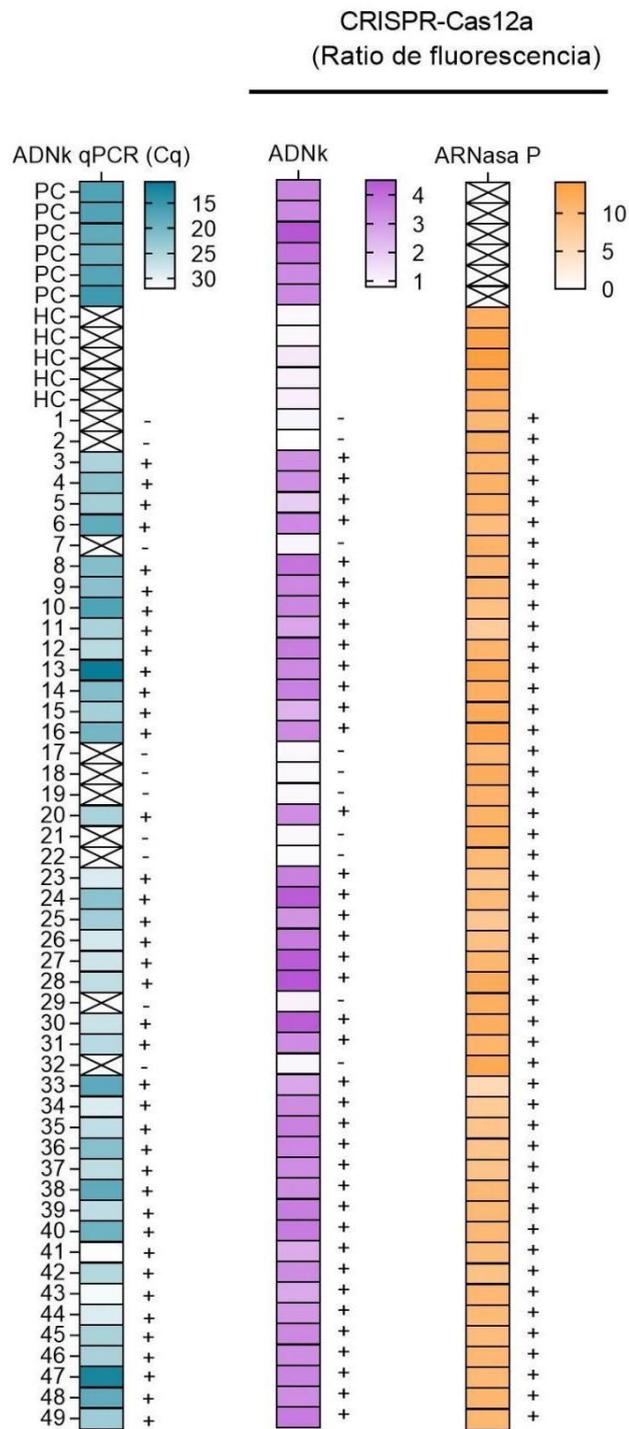
\*\*N/A: no aplica /not applicable

En el caso del control humano ARNasa P (control de calidad de muestra), se tomó de referencia el criterio reportado por Khan *et al.* (2021) <sup>92</sup>. Un valor de razón de fluorescencia mayor a 5 (en 10 minutos de lectura) indica detección de esta diana y ello permite interpretar como válidos los resultados obtenidos en muestras clínicas respecto a la ausencia de detección de ADN de *Leishmania*. El gen ARNasa P fue detectado en todas las muestras clínicas (n=49) analizadas (Figura 17), con valores de razón de fluorescencia altos (rango, 7.410 – 12.788) en el punto de tiempo de 10

minutos de la reacción CRISPR. Solo la muestra CL-33 presentó un valor de razón de fluorescencia de 5.482.

*-Comparación de resultados del ensayo de qPCR-ADNk (data de Cq) versus el ensayo PCR/CRISPR-ADNk (valor de razón de fluorescencia)*

Como se observa en la Figura 17, se compararon los resultados de la prueba PCR en tiempo real (Cq detectado/no detectado) y de la prueba PCR/CRISPR-ADNk (valor de razón de fluorescencia). Los resultados positivos de la prueba de referencia se observan en los cuadros de color celeste, la intensidad de color se relaciona con el valor de Cq que se obtuvo en cada muestra. Por ejemplo, las muestras CL-13 y CL-47 presentaron valores de Cq de 10.73 y 12.13, respectivamente, ambas representadas por el color más intenso. Mientras que aquellos cuadros con colores pálidos representan muestras con Cq altos ( $Cq > 28$ ). Cabe resaltar que el valor de Cq es inversamente proporcional a la cantidad de ADN de *Leishmania* presente en la muestra. En lo que respecta al ensayo CRISPR dirigido al ADNk, los valores de la razón de fluorescencia de las muestras positivas abarcaron valores entre 1.907 y 4.491 y de las muestras negativas entre 0.889 y 1.051.



**Figura 17.** Mapa de calor (*heatmap*) de los resultados de las pruebas qPCR-ADNk (Cq) vs. PCR/CRISPR-ADNk (valores de razón de fluorescencia), en muestras clínicas (n = 49). PC: control positivo, HC: control humano, (+): resultado positivo, (-): resultado negativo.

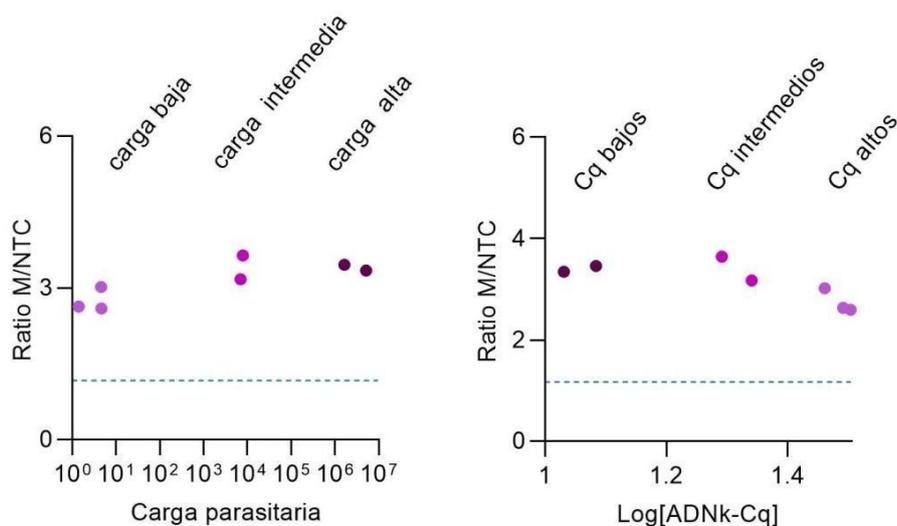
*-Desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en el rango de carga parasitaria estimada por el ensayo de qPCR-ADNk*

Según los resultados del ensayo de qPCR-ADNk, las muestras CL-41, CL-44 y CL-43, las dos primeras provenientes de hisopados y la tercera de una biopsia, fueron las que presentaron los valores de carga parasitaria más bajos: 4.61, 4.50 y 1.40 parásitos/10<sup>6</sup> células humanas (correspondiente a 0.025, 0.022 y 0.003 equivalentes genómicos de parásitos), respectivamente. Cabe resaltar que la prueba de PCR convencional diagnóstica (cPCR-ADNk; López *et al.* 1993)<sup>84</sup> no logró detectar ADN de *Leishmania* en esas muestras, mientras que con el sistema PCR/CRISPR los valores de la razón de fluorescencia alcanzados a los 20 minutos de la reacción de Cas12a fueron de 2.596, 3.020 y 2.636, respectivamente. En base al punto de corte (razón de fluorescencia >1.151), estas muestras resultaron positivas a detección de ADN de *Leishmania* (Figura 18, panel izquierdo, círculos de color lila indicativos de carga parasitaria baja).

Con respecto a las muestras que presentaron carga parasitaria intermedia, se muestran dos muestras, CL-04 y CL-40, que contenían 6974 y 7828.35 parásitos/10<sup>6</sup> células humanas, respectivamente, las cuales alcanzaron los valores de la razón de fluorescencia de 3.172 y 3.645 en cada caso (Figura 18, panel izquierdo, círculos de color morado).

Por otro lado, del panel de 39 muestras positivas por la qPCR, las muestras CL-13 (tomada de la lesión cutánea mediante el uso de un cepillo de citología) y CL-47 (obtenida por raspado de la lesión con una lanceta) contenían la mayor carga

parasitaria con  $1.6 \times 10^6$  y  $5.2 \times 10^6$  parásitos/ $10^6$  células humanas, respectivamente. En estos casos los valores de la razón de fluorescencia a los 20 minutos de la reacción CRISPR fueron de 3.348 para la muestra CL-13 y 3.4607 para la muestra CL-47 (Figura 16, panel izquierdo, círculos de color púrpura). Estos resultados indican que no hay una relación proporcional directa entre la carga parasitaria o valores de Cq y los valores de la razón de fluorescencia de la reacción de Cas12a (Figura 18). Esto se debe a que se empleó como ADN *input* en el ensayo Cas12a un amplicón generado en una PCR de punto final y no en la fase exponencial de la amplificación por PCR. A diferencia de los valores de Cq que sí fueron determinados en la fase exponencial de la reacción de amplificación.



**Figura 18.** Los valores de la razón de fluorescencia del ensayo PCR/CRISPR-ADNk en el rango de carga parasitaria determinada por la prueba qPCR-ADNk en un panel de muestras clínicas. M/NTC: valor en RFU de la muestra problema/ valor en RFU del control NTC, ambos a los 20 min de la reacción CRISPR.

Al comparar el valor de la razón de fluorescencia promedio de 3.35, obtenido por la prueba PCR/CRISPR-ADNk, de las 39 muestras clasificadas como positivas por

la prueba de referencia qPCR-ADNk, con el valor de la razón de fluorescencia promedio de 0.946 de las 10 muestras clasificadas como negativas, se encontró que el primer valor de la razón es aproximadamente 3.5 veces más alto que el segundo valor de la razón de fluorescencia. Esto demuestra que se produce una clara distinción entre las muestras detectadas y no detectadas por la prueba PCR/CRISPR-ADNk.

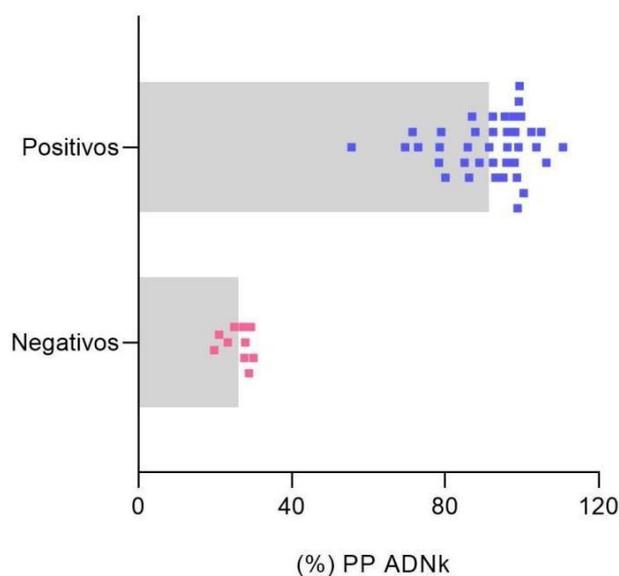
En este estudio, en una primera evaluación con la prueba PCR/CRISPR-ADNk se presentaron dos casos de resultados falsos positivos en las muestras CL-01 y CL-32 (ambas presentaron valores de razón de fluorescencia superiores al punto de corte), las cuales fueron catalogadas como negativas por el ensayo qPCR. La repetición de la prueba PCR/CRISPR-ADNk permitió definir dichas muestras como negativas dado que se obtuvieron valores de razón de fluorescencia de 1.010 y 0.970, respectivamente.

(ii) Basado en el análisis del porcentaje de positividad

Los datos obtenidos luego de dividir el valor de RFU tomado a los 20 minutos de la reacción CRISPR de la muestra problema entre el valor RFU del control positivo de la placa de ensayo correspondiente y multiplicado por 100 permitieron calcular el porcentaje de positividad (PP) para cada muestra clínica.

Para 13 muestras (seleccionadas al azar) se realizaron dos repeticiones del ensayo PCR/CRISPR-ADNk de manera independiente; en estos casos se trabajó con el promedio de ambos valores de PP. Como paso siguiente se intentó realizar la regresión logística pero dado que los resultados del ensayo PCR/CRISPR-ADNk

(data de PP) y de la prueba de referencia (Cq detectado/no-detectado) presentaron una separación perfecta, no se pudo realizar el ajuste estadístico. Esto indicó que la variable predictora (PP) predice perfectamente la variable de resultado Y (resultado del ensayo qPCR-ADNk) ya que  $PP > 29.995$  corresponde a  $Y = 1$  (detectado) y  $PP \leq 29.995$  corresponde a  $Y = 0$  (no detectado).



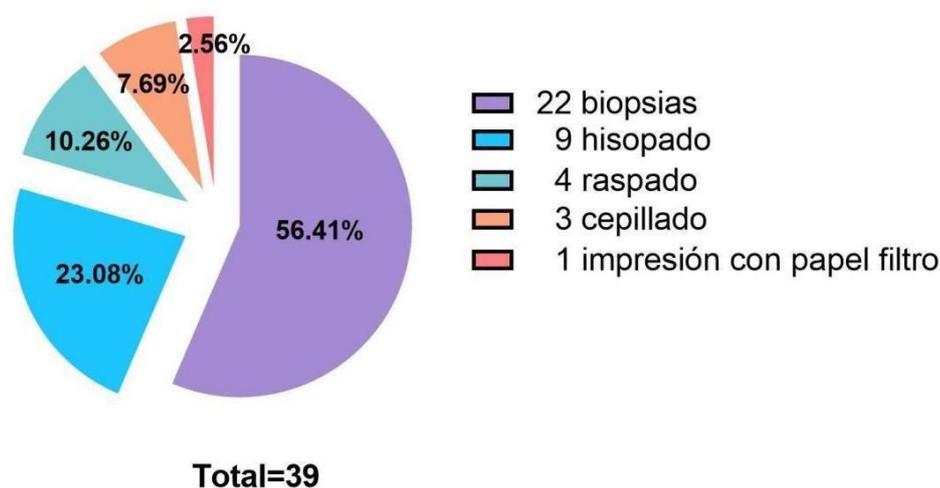
**Figura 19.** Resultados de los análisis del porcentaje de positividad (PP). Las barras en color gris indican la media del valor de PP para las muestras clasificadas como positivas y negativas.

Los valores de PP de las muestras clasificadas como positivas abarcaron entre 55.58% - 110.66%, mientras que las muestras negativas tuvieron valores de PP entre 19.758% - 29.995% (Figura 19).

- Comparación de tres pruebas de detección molecular cPCR, qPCR y PCR/CRISPR-Cas12a dirigidas al ADNk

Los ensayos de la PCR convencional y qPCR tienen en común el juego de cebadores utilizados; sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados. El análisis previo por la PCR convencional catalogó a 36 muestras como positivas a detección de ADN de *Leishmania (Viannia) spp.* y a 13 muestras con resultado negativo. Con la prueba qPCR, en base a los valores de Cq detectados se obtuvo 39 muestras positivas (correspondientes al 79.6% de las muestras evaluadas), mientras que 10 muestras (20.4%) resultaron negativas.

Las 39 muestras positivas por el ensayo de qPCR-ADNk fueron corroboradas con la prueba PCR/CRISPR-ADNk. El porcentaje de muestras positivas según el tipo de muestra, tomada por métodos invasivos (biopsias, raspados con lanceta) o no-invasivos (hisopado, cepillo de citología, impresión con papel filtro), se presenta en la Figura 20.



**Figura 20.** Tipo de muestra tomada por métodos invasivos o no invasivos, correspondiente a las muestras positivas por qPCR-ADNk y PCR/CRISPR-ADNk.

Finalmente, el análisis de concordancia indicó que la prueba PCR/CRISPR-ADNk mostró un PPA del 100.0% (IC 95% = 91.0 - 100.0%) y un NPA del 100.0% (IC 95% = 72.2 - 100.0%) en relación con la prueba qPCR-ADNk. Los resultados del cálculo del índice Kappa de Cohen indicaron un valor de Kappa de 1 (IC 95% = 0.72 - 1.28), consistente con una concordancia perfecta entre ambos métodos. La prueba cPCR-ADNk alcanzó un PPA de 92.3% (IC 95% = 79.7 - 97.3%) y un NPA de 100.0% (IC 95% = 72.2 - 100.0%). El valor de Kappa fue 0.83, consiste con una concordancia excelente entre los métodos de cPCR-ADNk y qPCR-ADNk.

## VII. Discusión

En el presente trabajo se desarrolló y evaluó la prueba de PCR/CRISPR-ADNk basada en la amplificación de una secuencia conservada en el ADN de minicírculos del kinetoplasto de *Leishmania (Viannia)* spp. por PCR convencional y posterior reconocimiento, corte (actividad en *cis*) y detección de la diana mediada por la actividad colateral de la endonucleasa LbCas12a. El proceso inició con la validación analítica de la prueba; para ello se realizó la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica. Luego, esta prueba fue aplicada en muestras de ADN provenientes de lesiones de piel de pacientes con diagnóstico conocido de leishmaniasis cutánea o no-LC (confirmado por cPCR-ADNk), con la finalidad de establecer la prueba de concepto de un método molecular nuevo basado en CRISPR para la detección altamente específica y sensible de las principales especies de *Leishmania (Viannia)* que causan la enfermedad leishmaniasis tegumentaria americana en nuestra región.

Los resultados de la prueba PCR/CRISPR-ADNk mostrados fueron tomados en un punto de tiempo de 20 minutos debido a que en este intervalo se logra alcanzar una señal discriminativa <sup>75</sup>. La cinética de la reacción CRISPR indica que el tiempo de lectura se puede extender hasta los 50 min si se trabaja con la cinética de Cas12a a 25°C o a los 30 min si la reacción de Cas12a se da a 37°C.

Con esta condición establecida, la prueba alcanzó una sensibilidad analítica de 0.05 e.g.p (correspondiente a 4.25 fg de ADN del parásito/reacción). Este nivel de sensibilidad de detección es alto y fue tan solo de un orden de magnitud mayor a lo

reportado por Jara *et al.* (2013), en cuyo trabajo con la prueba de qPCR-ADNk detectaron 0.005 e.g.p por reacción <sup>48</sup>.

En este sentido, León *et al.* (2018) reportaron que su ensayo de PCR convencional-ADNk, donde emplearon la cepa *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 para la evaluación de la sensibilidad, detectó 0.10 e.g.p. <sup>97</sup> y este fue menos sensible que la prueba PCR/CRISPR-ADNk. En contraste, otras dos investigaciones realizadas por Dish *et al.* (2005) <sup>98</sup> y Oliveira *et al.* (2011) <sup>99</sup> (este último trabajó con los cebadores MP3H/MP1L) mostraron que sus pruebas alcanzaron detectar 0.025 e.g.p/reacción; es decir, un límite de detección dos veces menor (más sensible) que la prueba PCR/CRISPR-ADNk desarrollada en el presente estudio. En resumen, estos ensayos moleculares permiten detectar menos de 1 parásito por reacción. Ello es posible debido a la presencia de múltiples copias de ADNk (~10,000) en cada célula de *Leishmania* <sup>100</sup>. Esto indica que la prueba desarrollada en el presente estudio podría tener relevancia en el diagnóstico de pacientes con LC y en la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, ya que sería capaz de detectar infecciones con densidad de parásitos muy baja <sup>29,48</sup>.

Es importante resaltar que el diseño y la elección de los cebadores para la prueba PCR de *Leishmania* es relevante porque influye en la sensibilidad de la técnica, y puede permitir la diferenciación de especies de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*. Sin embargo, en el sistema propuesto la especificidad proviene exclusivamente del crARN-ADNk. Esto es debido a que los cebadores requeridos para el paso de pre-amplificación de la región del ADN de minicírculos no fueron diseñados exclusivamente para la detección de *L. (Viannia)* spp., sino que la

selección de los cebadores se basó en que estuvieran ubicados en la región conservada del ADNk que abarca a la secuencia de reconocimiento del crARN-ADNk diseñado y que conforma el primer filtro de especificidad para ADN de *Leishmania*. Este último fue diseñado en base a una secuencia del ADN del minicírculo altamente conservada en especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. Por ende, se esperaba que solo esas especies de *L. (Viannia)* fueran detectadas al utilizar como ADN diana el producto de amplificación generado por el par de cebadores 1 y 2.

La evaluación de la especificidad analítica demostró que la prueba CRISPR que utiliza el crARN-ADNk diseñado en este estudio, en combinación con el par 1 de cebadores del ADNk en el paso de pre-amplificación de la diana, es específica para la detección de especies del subgénero *Leishmania (Viannia)*. En contraste, la pre-amplificación de la diana con el par 2 de cebadores resultó en la detección de distintas especies de *Leishmania* tanto del subgénero *Leishmania* como del subgénero *Viannia* evaluadas (n=3 experimentos independientes).

La diferencia entre los cebadores evaluados frente a un solo crARN-ADNk radica en el tamaño y composición nucleotídica de los fragmentos amplificados. El par 1 (cebadores F1/R) permite amplificar una región del minicírculo del ADNk (116 pb) que abarca a los tres bloques de secuencia conservada (CSB 1, 2 y 3) (Figura 3). En cambio, el par 2 (cebadores MP1L/R) permite amplificar un fragmento (138 pb) que abarca un segmento de ~22 pb localizado inmediatamente adyacente (corriente

arriba o, en inglés, *upstream*) al bloque CSB-1, además, de contener los bloques CSB-1, 2 y 3 (Figura 3).

A pesar de que no se realizó la secuenciación de los productos de PCR, se plantea las posibles hipótesis que pueden haber influido en la detección mediada por Cas12a, dada la presencia de una pequeña secuencia no conservada en el producto de amplificación del ADNk realizado con el par 2 de cebadores. Cabe mencionar que Fonfara y su equipo informaron que la región de escisión correspondiente a los nucleótidos 1-4 en el sitio distal de PAM, utilizando la enzima FnCas12, fue sensible a *mismatches*; sin embargo, indican que los *mismatches* en la región semilla del crARN no son tolerados y concluyeron que puede haber factores adicionales que influyan en la especificidad, como la secuencia de nucleótidos de la diana <sup>78</sup>

Como primer punto, se hipotetiza que esta pequeña región no tan conservada donde se une el cebador *forward* MP1L (del par 2) pueda contener una secuencia PAM no canónica reconocida por la nucleasa Cas12a, como lo reportan Yamano y colaboradores <sup>64</sup>, en su trabajo publicado en el 2016. Además, como segundo punto a considerar es la posible presencia de polimorfismos en las moléculas derivadas de una determinada clase de minicírculos, como se encontró previamente en *L. tarentolae* <sup>101</sup> y como lo sugiere el estudio realizado por Camacho y colaboradores <sup>102</sup>. En este último, se estudió la región del minicírculo del ADNk de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis*. Se encontró una región de 150 pb en la que los bloques de secuencia conservada (CSB1-3) estaban presentes en posiciones equivalentes en la secuencia consenso. Además, se encontró un segundo motivo conservado similar al bloque CSB-2 en *L. (V.) braziliensis*; sin embargo, este

motivo no está conservado en los minicírculos de *L. (L.) major* y *L. (L.) infantum*<sup>102</sup>. Estos dos factores pueden haber permitido el reconocimiento por el crARN y la generación de señal detectable en el ensayo de Cas12a al evaluar las muestras de ADN de especies del subgénero *L. (Leishmania)* pre-amplificado con el par 2 de cebadores.

La posterior verificación *in silico* de la especificidad de la secuencia de reconocimiento de 20 pb (segmento guía del crARN-ADNk, complementario a la secuencia de ADN diana) realizada contra *L. (L.) major* resultó en un *match* de 100% contra dos aislados en particular: Lm-FR-8 y Lm-FR-19. Mientras que en el caso de *L. (L.) infantum*, más del 95% de las secuencias disponibles en GenBank presentaron una similitud considerable. Cabe resaltar que en los casos señalados de *match in silico*, la secuencia PAM canónica en el ADN diana no estaba presente y aquellos en donde sí se encontraba, la región de reconocimiento no era idéntica.

De otro lado, dada la importancia de evaluar la exclusividad de la prueba en lograr la detección específica de *Leishmania (Viannia) spp.*, se incluyó en el análisis el ADNg de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, un tripanosomátido filogenéticamente relacionado a *Leishmania*. Con la muestra de *T. cruzi* cepa Y se obtuvo un valor de razón de fluorescencia (media  $\pm$  DE:  $0.987 \pm 0.116$ ; n=4) que corresponde a una señal de ruido de fondo, no diferenciable de los controles negativos del ensayo (se interpreta como ‘no-detectado’), lo cual demostró que no se produjo reacción cruzada en esta prueba. Ésto guarda concordancia con los resultados de diversos estudios realizados utilizando las técnicas de PCR y qPCR dirigidas a regiones

conservadas del ADNk, en cuyos análisis se incluyó como mínimo una cepa de *T. cruzi* como la cepa Y<sup>98</sup>, CL-Brener<sup>103</sup>, Tulahuen<sup>1</sup>, Sylvio-x10<sup>53</sup> y DM28c<sup>104</sup>. En estos estudios no se observó reacción cruzada con las cepas de *T. cruzi* evaluadas. Cabe resaltar que, dada la endemicidad de la enfermedad de Chagas en varias regiones en Latinoamérica, en el presente trabajo se evaluó una cepa de *T. cruzi*. Por lo tanto, es importante extender la evaluación de la prueba PCR/CRISPR-ADNk a otras cepas, así como a otras especies de *Trypanosoma* circulantes en la región.

Asimismo, en otras investigaciones la exclusividad fue evaluada utilizando ADN de especies de microorganismos patógenos asociadas al diagnóstico diferencial de leishmaniasis. Por ejemplo, Wu y colaboradores trabajaron con especies como *Mycobacterium leprae*, *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*<sup>105</sup>, mientras el equipo de León por su parte utilizó *Mycobacterium tuberculosis* y *Sporothrix schenckii*<sup>97</sup>. En el primer trabajo, donde se empleó la qPCR dirigida al ADNk, no se produjo reacción cruzada<sup>105</sup>. En el segundo, en contraste, el ensayo PCR-ADNk detectó a *M. tuberculosis*. Los investigadores indican que este resultado podría deberse al uso de cebadores degenerados; sin embargo, esto no concordó con los análisis *in silico* previos<sup>97</sup>. En el presente trabajo se realizó la evaluación, con herramientas bioinformáticas, de 8 agentes patógenos implicados en el diagnóstico diferencial de leishmaniasis cutánea (Sección 5.5.1). Estos patógenos no se evaluaron experimentalmente, lo que sería de importancia de realizar posteriormente.

Además, fue de gran relevancia para el presente estudio evaluar *in silico* y experimentalmente la secuencia genómica de *Homo sapiens* y el ADN humano, respectivamente, debido a que es sumamente importante que la prueba desarrollada no dé reacción cruzada con el genoma humano cuando ésta se evalúe en muestras clínicas (con posible aplicación diagnóstica). En la prueba PCR/CRISPR-ADNk, con la muestra de ADN genómico humano (extraído de PBMCs) se obtuvo un valor de la razón de fluorescencia (media  $\pm$  DE:  $0.999 \pm 0.125$ ; n=4) que indica que no fue detectado.

Posterior a la validación analítica, en el presente estudio se evaluó el desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en un panel de muestras clínicas. Los resultados obtenidos mostraron concordancia perfecta (100%) con la prueba de qPCR-ADNk a nivel de detección de los casos positivos (n=39) y definición de los casos negativos (n=10). Esto fue corroborado con el índice de Kappa de Cohen (kappa =1, IC 95% = 0.72 - 1.28). Posteriormente, estos resultados ameritan ser extendidos en un estudio futuro prospectivo de validación clínica con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica y de esta manera se pueda evaluar la capacidad discriminativa y predictiva de la prueba PCR/CRISPR-ADNk para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.

De las tres pruebas de detección molecular empleadas en el análisis de las muestras clínicas que se evaluaron en este estudio, las pruebas PCR/CRISPR-ADNk y qPCR-ADNk lograron detectar ADN de *Leishmania* en tres muestras que contenían muy baja carga parasitaria (alrededor de 1-5 parásitos por  $10^6$  células humanas). En

contraste, la cPCR-ADNk (reacción dúplex que incluye un control interno humano), empleada en la rutina diagnóstica, fue menos sensible y catalogó esas 3 muestras como negativas. Una posible causa de este resultado es que la PCR dúplex tiene como desventaja una sensibilidad menor de detección debido a la competencia de los cebadores por las secuencias diana y por los reactivos. Asimismo, el formato dúplex requiere una concentración inicial mayor de las secuencias diana <sup>106</sup>. Por otro lado, la principal ventaja de este tipo de prueba es que permite tener un control interno humano en cada reacción y de esta manera se puede validar los resultados negativos (ADN de *Leishmania* no-detectado). Mientras que, en el caso de las pruebas basadas en PCR/CRISPR y qPCR (empleando SYBR Green) que tienen por diana al ADNk de *Leishmania*, el gen humano (*POP7*, que codifica a ARNasa P; y *ERV-3*, respectivamente) empleado como control de calidad de las muestras clínicas se evaluó como control externo (en reacciones independientes).

En este punto es importante mencionar que en el caso de la cPCR-ADNk dúplex diagnóstica las muestras de ADN se evaluaron tanto sin diluir como diluidas en relaciones 1/10, 1/100 y hasta 1/1000 con la finalidad de evitar inhibición por altas concentraciones de ADN (en el caso de las tres muestras con carga parasitaria baja se probó agregar una concentración de 10 ng de ADN, obteniéndose nuevamente resultados negativos). Mientras que en el ensayo PCR/CRISPR-ADNk se agregó 5 µL de la muestra diluida 1/10 correspondiente a un rango de 9.5 - 214 ng de ADN *input* en la reacción. De otro lado, en el ensayo qPCR-ADNk se requirió de 10 ng de ADN *input* en la reacción.

Otra diferencia resaltante entre estas pruebas fue que en la cPCR-ADNk se realizó 40 ciclos de amplificación, mientras que en la PCR/CRISPR-ADNk se trabajó con

45 ciclos de pre-amplificación seguido de la detección por Cas12a. Mientras que en la qPCR-ADNk solo se requirió 35 ciclos, dado que la detección de los valores de Cq (ciclo umbral) se realiza en la fase exponencial de la reacción.

En torno a la especificidad, es importante resaltar que las muestras clínicas evaluadas en este estudio y con resultado positivo a detección de ADN de *Leishmania* no pudieron ser tipificadas para conocer la especie de parásito infectante. Sin embargo, las muestras provienen de regiones de endemicidad de leishmaniasis en Cusco donde *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* son los principales agentes etiológicos de leishmaniasis tegumentaria <sup>86</sup>.

Una de las posibles limitaciones de la prueba desarrollada en este estudio es la necesidad de realizar dos pasos enzimáticos acoplados, puesto que ello incrementa el riesgo de una posible contaminación por aerosoles y la ocurrencia de falsos positivos. Sumado a lo anterior, la naturaleza del biomarcador ADNk de minicírculos, cuyo número de copias múltiple brinda una alta sensibilidad de detección, hace que la prueba sea propensa a resultados falsos-positivos. En este trabajo, la tasa de falsos positivos del ensayo PCR/CRISPR de ADNk fue del 4,1% (ésto es, 2 falsos positivos de 49 muestras de pacientes), mostrando una precisión del 95,9% (47/49 resultados de la prueba PCR/CRISPR-ADNk de acuerdo con los resultados de qPCR-ADNk). Por ello, posteriormente se realizaron repeticiones de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en un grupo de muestras clínicas para validar los resultados. En el trabajo reportado por Eberhard *et al.* (2018), este tipo de reacciones falsas positivas fueron reducidas combinando la diana ADNk con 18S

ADNr en un ensayo de qPCR múltiplex basado en sondas TaqMan y estableciendo un valor de corte para los valores de Cq para excluir muestras con resultados falsos positivos <sup>107</sup>.

Los resultados falsos positivos se pueden generar principalmente por contaminación por productos de PCR. Este factor se puede evitar al mantener un flujo de trabajo unidireccional que involucre áreas separadas en el laboratorio. Otra manera de minimizar las posibles contaminaciones es realizar el procesamiento de las muestras clínicas en grupos de 10-12 muestras, tal como se hizo en este estudio. Esto indica la importancia de incorporar controles negativos internos y/o externos e incluso considerar incluir más de un control positivo para la correcta interpretación de los resultados de cada ensayo <sup>108</sup>.

Además, es importante resaltar que la presencia de resultados falsos positivos en el proceso de diagnóstico puede dar lugar a terapias innecesarias con fármacos potencialmente tóxicos. De otro lado, los resultados falsos negativos (no observados en este estudio) pueden dar lugar a cursos prolongados de la enfermedad, una utilización mayor de recursos para repetir las pruebas y que el paciente experimente dolor al no recibir un tratamiento específico de manera oportuna <sup>109</sup>.

De otro lado, uno de los aspectos importantes de la prueba desarrollada en este estudio es que se evaluó con cinco tipos diferentes de toma de muestra a partir de las lesiones cutáneas de pacientes. Los métodos no invasivos de toma de muestra utilizados (cepillado, hisopado, impresión con papel filtro) son un factor importante

a considerar en la detección de infecciones por *Leishmania* en muestras clínicas debido a que facilitan el diagnóstico temprano, al ser métodos bien tolerados por los pacientes y asequibles <sup>30</sup>. Cabe mencionar que comúnmente se observa una variación significativa en la precisión diagnóstica de los métodos de diagnóstico molecular para LC, según el tipo de muestra, el tiempo de evolución de la lesión, el método de recuperación de ADN y la prueba molecular <sup>110</sup>. Por ejemplo, el uso de hisopo y la impresión de la lesión cutánea con papel filtro son los métodos de recuperación más eficientes, sensibles y específicos para la detección de ADN de *Leishmania* <sup>111-113</sup>. Otro de los métodos empleados es el cepillado mediante el uso de un cepillo de citología, como lo reportan Cantanhêde y colaboradores, quienes encontraron que con esta técnica el ensayo PCR-ADNk alcanzó una sensibilidad de 98.8%, siendo más sensible que la detección por microscopía (49.4%) <sup>111</sup>. Además, en el estudio de Suárez *et al.* (2015) <sup>52</sup>, donde se analizaron distintas zonas de las úlceras cutáneas y distintos métodos de toma de muestra para fines de diagnóstico, se reportó que la mayor carga parasitaria se obtiene cuando la muestra es tomada de la base (borde interno) y del centro de las lesiones cutáneas, a diferencia de cuando se toma del borde de la úlcera. Sus evaluaciones concluyeron que la toma de muestra por raspado y cepillado constituye los métodos más apropiados, dado que la sensibilidad no se vio modificada respecto a la técnica invasiva de biopsia, cuya principal desventaja es que se requiere personal médico especializado para su toma <sup>52</sup>.

Recientemente se publicó la primera investigación en torno a sistemas CRISPR aplicados a la detección de *Leishmania* <sup>26</sup>. En ese trabajo se desarrolló y aplicó el

sistema CRISPR/dCas9 a la detección de *Leishmania* spp. causantes de leishmaniasis visceral. La novedosa plataforma opera a temperatura ambiente (23 °C), está basada en la amplificación isotérmica por RPA y utiliza una endonucleasa Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) dirigida por un ARN guía (sgARN) para el reconocimiento de la diana ADNk. El reconocimiento de la diana activa, a su vez, una reacción de amplificación por círculo rodante (RCA). La lectura es visual vía DNazimas (complejos G-cuádruplex-hemina) y el método tiene potencial adaptable para el diagnóstico POC de leishmaniasis visceral. En dicho estudio no se validó la prueba con muestras clínicas. Se reportan las evaluaciones analíticas en muestras simuladas de orina y sangre, con resultados buenos a nivel de desempeño de la prueba <sup>26</sup>.

Finalmente, en la actualidad el diagnóstico de LC sigue siendo un desafío, dada las manifestaciones clínicas pleomórficas que se presentan en esta enfermedad. Las lesiones cutáneas varían en gravedad, apariencia clínica y duración; en algunos casos, pueden ser indistinguibles de las lesiones relacionadas con otras enfermedades <sup>114</sup>. Es por ello que el diagnóstico temprano y preciso de LC es un pre-requisito para una intervención terapéutica eficiente.

Es imprescindible el continuo desarrollo de métodos de detección molecular mejores porque éstos logran alcanzar y combinar la mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica para leishmaniasis. Así como también es necesario implementar protocolos que puedan ser simplificados y adaptados a formatos portátiles y de costo bajo, facilitando así su adopción en zonas endémicas rurales.

Actualmente destacan los sistemas CRISPR/Cas que tienen la gran ventaja de poder lograr la detección de ácidos nucleicos diana de manera muy específica, tal como se demostró en este trabajo aplicado a la detección de *Leishmania (Viannia) spp.* La problemática de la accesibilidad al diagnóstico y la prevención de la progresión de la enfermedad en zonas endémicas rurales pueden ser solucionadas con herramientas moleculares con demostrada alta sensibilidad y especificidad, tales como la PCR (que puede trasladarse a un instrumento portátil como el Palm PCR) y los sistemas CRISPR. Es por ello importante seguir realizando evaluaciones que permitan optimizar, simplificar y adaptar el sistema CRISPR-Cas12a a un formato POC (en el punto de atención), tal como se ha reportado en varios estudios que utilizan los sistemas CRISPR <sup>70,115</sup>. En este contexto, dentro de las perspectivas futuras, existen distintas opciones. La primera, evaluar la posibilidad de que el ensayo PCR/CRISPR pueda ser integrado y adaptado a equipamiento portátil de mayor asequibilidad y fácil uso en campo, tales como el Palm PCR™, probada en campo para detección de *Leishmania*, *Mycobacterium* y otros agentes circulantes en zonas rurales de Perú <sup>53</sup>, y Bento Lab®, un laboratorio móvil para la PCR de amplio uso en análisis genéticos de campo <sup>54</sup>. Para la lectura de fluorescencia del ensayo de Cas12a puede hacerse uso de un fluorímetro portátil aplicable en campo, tal como lo reportan Lee *et al.* (2020) para la detección de *Plasmodium* <sup>24</sup>. La segunda opción consiste en incorporar, estandarizar y optimizar una nueva estrategia de pre-amplificación de la diana genética que idealmente requiera de instrumentación más simple; por ejemplo, mediante la técnica de amplificación isotérmica LAMP (para reducir el uso de equipos costosos como el termociclador). El paso de pre-amplificación isotérmica puede acoplarse a la detección mediada por

Cas12a integrando el sistema a un formato de lectura visual de los resultados con tiras de flujo lateral. Cualquiera sea el abordaje a emplearse, estos instrumentos para uso POC requieren ser validados en condiciones de campo. La tercera opción contempla afinar las condiciones experimentales del ensayo CRISPR para optimizar las propiedades cinéticas de la enzima Cas12a, con el fin de prescindir del paso de pre-amplificación de la secuencia diana <sup>19,72</sup>. Con ello se espera lograr una detección directa (sin pre-amplificación) de concentraciones de la diana de significancia clínica. De esta manera se evitaría los resultados falsos positivos generados por una posible contaminación con amplicones. La cuarta opción sería utilizar una sonda reportera cuyo rango de longitud de onda de emisión de fluorescencia se encuentre dentro del espectro visible o UV, con lo cual se pueda reducir el tiempo de lectura de resultados dado que podría realizarle una lectura visual en un transiluminador y/o pueda ser analizada con fluorómetros portátiles <sup>116,117</sup>, dado que la sonda empleada en este estudio se encuentra en una longitud de onda de 520-570nm por lo que no es posible utilizarla para estas dos aproximaciones POC.

Finalmente, estas diferentes opciones son compatibles con la posibilidad de liofilizar los reactivos de la reacción CRISPR (enzima Cas, crARN, sonda reportera) y de la reacción de pre-amplificación, lo que mejora su estabilidad para el transporte y almacenamiento a temperatura ambiente con fines de aplicación en campo <sup>24</sup>. Esto permitirá la distribución de la prueba en un formato de kit, haciendo factible su uso en los diferentes niveles de atención. En resumen, todo el ensayo puede integrarse con formatos accesibles, fáciles de usar y de costo bajo, con el requerimiento de

equipamiento mínimo para biología molecular, lo que contribuiría a los esfuerzos de diagnóstico de casos sospechosos de leishmaniasis en distintas regiones endémicas. Ello constituiría la posibilidad de lograr transferir e implementar la prueba PCR/CRISPR-ADNk (luego de una viable futura validación clínica) para el diagnóstico de leishmaniasis a nivel de centros de referencia y laboratorios de investigación, donde son referidos los pacientes o sus muestras.

## VIII. Conclusiones

- Se desarrolló una prueba de detección molecular basada en PCR/CRISPR y que tiene por diana al ADNk. Esta prueba logra detectar hasta  $5 \times 10^{-2}$  equivalentes genómicos de parásitos de *Leishmania*. Esta sensibilidad analítica fue similar a la prueba de referencia qPCR-ADNk.
- El crARN-ADNk diseñado para la prueba PCR/CRISPR-ADNk, en combinación con el par 1 de cebadores usado en el paso de pre-amplificación del ADNk, detecta con nivel alto de discriminación las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* (causantes del mayor número de casos de leishmaniasis tegumentaria en las regiones endémicas del Perú y países vecinos en Latinoamérica), mientras que no detecta especies del subgénero *Leishmania*.
- La prueba PCR/CRISPR-ADNk no generó reacción cruzada con ADN humano ni con ADN extraído de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.
- En la evaluación del desempeño de la prueba PCR/CRISPR-ADNk en muestras clínicas se obtuvo 100% de concordancia con la prueba de qPCR-ADNk (a nivel de Cq detectado/no-detectado), prueba cuantitativa de alta sensibilidad y especificidad <sup>48</sup> utilizada como método de referencia en este estudio.
- Se demostró el potencial de la prueba PCR/CRISPR-ADNk como una generación nueva de herramientas moleculares de futura aplicabilidad (luego de la optimización, simplificación y validación clínica más extensa) en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana.

## IX. Limitaciones

- El acceso a muestras fue una limitante, motivo por el cual no se incluyó un grupo adicional de muestras negativas (catalogadas por la PCR en tiempo real) para realizar la comparación de resultados con la prueba PCR/CRISPR evaluada.

-El tiempo de procesamiento de la prueba PCR/CRISPR-ADNk desarrollada es relativamente largo (~2.5 h). Sin embargo, esta es una prueba de concepto realizada con el objetivo de comprobar el funcionamiento del sistema con muestras clínicas.

- El formato de pre-amplificación seleccionado (PCR) y el tipo de sonda reportera no permiten que este ensayo tenga una posible aplicación POC (*point-of-care*). Sin embargo, este ensayo basado en CRISPR podría ser adaptado a futuro si se considera combinarlo con técnicas de amplificación isotérmica de tipo LAMP o RPA (esta última tiene la desventaja de depender de kits costosos) que permitirían reducir aún más la duración de la prueba en comparación a la PCR. Además, esta prueba podría adaptarse y/o transferirse a equipos portátiles y formatos de costo bajo como tiras de papel de flujo lateral. Incluso los reactivos podrían ser liofilizados para asegurar su estabilidad en condiciones de campo y facilitar su distribución en formato de kit. De esta manera podría ser asequible para regiones rurales endémicas de leishmaniasis con acceso menor a pruebas moleculares.

Cabe resaltar que esta prueba en su versión actual podría ser transferida a laboratorios de referencia y de investigación que cuentan con la infraestructura y recursos para biología molecular.

## **X. Recomendaciones**

- Incluir los controles positivos y negativos por duplicado o triplicado. En el caso de los controles positivos considerar dos tipos: un control positivo que genere una señal robusta en el ensayo de Cas12a (ej.  $5 \times 10^4$  equivalentes genómicos de parásitos de *Leishmania*/reacción, como se empleó en este estudio) y un control positivo débil cercano al límite de detección del ensayo ( $5 \times 10^{-2}$  equivalentes genómicos de parásitos/reacción).
- Se recomienda procesar las muestras clínicas por duplicado.
- No almacenar productos de PCR indefinidamente para evitar posibles contaminaciones.
- En caso de que las áreas de trabajo se hayan contaminado con amplicones, limpiar las áreas con una solución de ADNasas.
- Preparar stocks de trabajo de los reactivos a utilizar en los procedimientos de la reacción de PCR y CRISPR/Cas.
- No utilizar las micropipetas de trabajo para otras actividades.
- Calibrar y dar mantenimiento a los equipos periódicamente.

## XI Referencias bibliográficas

1. Rosales-Chilama, M., Diaz-Moreno, N., Prieto, M. D., Giraldo-Parra, L., Martínez-Valencia, Á. J., & Gomez, M. A. (2020). Comparative Assessment of DNA Targets and Amplification Methods for *Leishmania (Viannia)* Detection in Human Samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(6), 1323–1327. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0691>
2. Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Maia-Elkhoury, A. M. A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Yajima, A., & Gasimov, E. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly Epidemiological Record*, 96(35), 401-419.
3. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
4. Saldarriaga, O. A., Castellanos-Gonzalez, A., Porrozzi, R., Baldeviano, G. C., Lescano, A. G., de Los Santos, M. B., Fernandez, O. L., Saravia, N. G., Costa, E., Melby, P. C., & Travi, B. L. (2016). An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous *Leishmania Viannia* spp. Infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004638. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004638>
5. Yon C. Situación epidemiológica de las leishmaniasis en el Perú, 2019. *Boletín Epidemiológico del Perú*. 2019; 28 (07): 195-196
6. Llanos-Cuentas, E. A., Marsden, P. D., Cuba, C. C., Barreto, A. C., & Campos, M. (1984). Possible risk factors in development of mucosal lesions in

- leishmaniasis. *Lancet* (London, England), 2(8397), 295.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)90346-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)90346-5)
7. Silva, J., Queiroz, A., Moura, I., Sousa, R. S., Guimarães, L. H., Machado, P., Lessa, M., Lago, E., Wilson, M. E., & Schriefer, A. (2017). Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in northeast Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(11), e0006015.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006015>
  8. Lainson, R., Ready, P. D., & Shaw, J. J. (1979). Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 206(1164), 307–318.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0107>
  9. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):839-47. doi: 10.1038/ng2053.
  10. Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, Tschudi C, Ullu E, Beverley SM. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog*. 2010 Oct 28;6(10):e1001161. doi: 10.1371/journal.ppat.1001161.
  11. S. L. Figueiredo de Sá, B., Rezende, A. M., Melo Neto, O. P., Brito, M., & Brandão Filho, S. P. (2019). Identification of divergent *Leishmania (Viannia) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through

whole genome analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6), e0007382.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007382>

12. Alexandre, J., Sadlova, J., Lestinova, T., Vojtkova, B., Jancarova, M., Podesvova, L., Yurchenko, V., Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S. P., & Volf, P. (2020). Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific reports*, 10(1), 3566. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60600-7>
13. Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(2), 1–20. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
14. Van der Auwera, G., & Dujardin, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
15. De Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C., Pessoa-E-Silva, R., Trajano-Silva, L. A., Gonçalves-de-Albuquerque, S., Tavares, D., Brelaz-de-Castro, M. C., Silva, R., & Pereira, V. R. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & bioscience*, 5, 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
16. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T.,

- Sabeti, P. C., Collins, J. J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
17. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
18. Li, S. Y., Cheng, Q. X., Wang, J. M., Li, X. Y., Zhang, Z. L., Gao, S., Cao, R. B., Zhao, G. P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell discovery*, 4, 20. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0028-z>
19. Nguyen, L.T., Smith, B.M. & Jain, P.K. Enhancement of *trans*-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection. *Nat Commun* 11, 4906 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18615-1>
20. Ai, J. W., Zhou, X., Xu, T., Yang, M., Chen, Y., He, G. Q., Pan, N., Cai, Y., Li, Y., Wang, X., Su, H., Wang, T., Zeng, W., & Zhang, W. H. (2019). CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 1361–1369. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1664939>
21. Xiao, G., He, X., Zhang, S., Liu, Y., Liang, Z., Liu, H., Zhang, J., Ou, M., Cai, S., Lai, W., Zhang, T., Ren, L., & Zhang, G. (2020). Cas12a/Guide RNA-Based Platform for Rapid and Accurate Identification of Major *Mycobacterium* Species. *Journal of clinical microbiology*, 58(2), e01368-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-19>

22. Xu, H., Zhang, X., Cai, Z., Dong, X., Chen, G., Li, Z., Qiu, L., He, L., Liang, B., Liu, X., & Liu, J. (2020). An Isothermal Method for Sensitive Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas12a *Cis* and *Trans* Cleavage. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 22(8), 1020–1029. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.212>
23. Cunningham, C. H., Hennelly, C. M., Lin, J. T., Ubalee, R., Boyce, R. M., Mulogo, E. M., Hathaway, N., Thwai, K. L., Phanzu, F., Kalonji, A., Mwandagalirwa, K., Tshefu, A., Juliano, J. J., & Parr, J. B. (2021). A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*, 68, 103415. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103415>
24. Lee, R. A., Puig, H., Nguyen, P. Q., Angenent-Mari, N. M., Donghia, N. M., McGee, J. P., Dvorin, J. D., Klapperich, C. M., Pollock, N. R., & Collins, J. J. (2020). Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25722–25731. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010196117>
25. Ma, Q. N., Wang, M., Zheng, L. B., Lin, Z. Q., Ehsan, M., Xiao, X. X., & Zhu, X. Q. (2021). RAA-Cas12a-Tg: A Nucleic Acid Detection System for *Toxoplasma gondii* Based on CRISPR-Cas12a Combined with Recombinase-Aided Amplification (RAA). *Microorganisms*, 9(8), 1644. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081644>

26. Bengtson, M., Bharadwaj, M., Franch, O., van der Torre, J., Meerdink, V., Schallig, H., & Dekker, C. (2022). CRISPR-dCas9 based DNA detection scheme for diagnostics in resource-limited settings. *Nanoscale*, *14*(5), 1885–1895. <https://doi.org/10.1039/d1nr06557b>
27. Cossio, A., Jojoa, J., Castro, M., Castillo, R. M., Osorio, L., Shelite, T. R., Gore Saravia, N., Melby, P. C., & Travi, B. L. (2021). Diagnostic performance of a Recombinant Polymerase Amplification Test-Lateral Flow (RPA-LF) for cutaneous leishmaniasis in an endemic setting of Colombia. *PLoS neglected tropical diseases*, *15*(4), e0009291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009291>
28. Van der Meide, W. F., Schoone, G. J., Faber, W. R., Zeegelaar, J. E., de Vries, H. J., Ozbel, Y., Lai A Fat, R. F., Coelho, L. I., Kassi, M., & Schallig, H. D. (2005). Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *Journal of clinical microbiology*, *43*(11), 5560–5566. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5560-5566.2005>
29. Weirather, J. L., Jeronimo, S. M., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M. A., Haque, R., Schriefer, A., Talhari, S., Carvalho, E. M., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2011). Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of clinical microbiology*, *49*(11), 3892–3904. <https://doi.org/10.1128/JCM.r00764-11>
30. de Vries, H. J., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American*

*journal of clinical dermatology*, 16(2), 99–109.

<https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>

31. Cruz, I., Millet, A., Carrillo, E., Chenik, M., Salotra, P., Verma, S., Veland, N., Jara, M., Adai, V., Castrillón, C., Arévalo, J., Moreno, J., & Cañavate, C. (2013). An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 134(3), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.026>
32. Alexander, J., Satoskar, A. R., & Russell, D. G. (1999). Leishmania species: models of intracellular parasitism. *Journal of cell science*, 112 Pt 18, 2993–3002. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.18.2993>  
Alexander, J., Satoskar, A. R., & Russell, D. G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of cell science*, 112 Pt 18, 2993–3002. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.18.2993>.
33. Ambit, A., Woods, K. L., Cull, B., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2011). Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryotic cell*, 10(11), 1429–1438. <https://doi.org/10.1128/EC.05118-11>
34. Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>
35. Jara, M., Berg, M., Caljon, G., de Muylder, G., Cuypers, B., Castillo, D., Maes, I., Orozco, M., Vanaerschot, M., Dujardin, J. C., & Arevalo, J. (2017). Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active

stage. *PloS* *one*, 12(7), e0180532.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180532>

36. Karunaweera, N. D., & Ferreira, M. U. (2018). Leishmaniasis: current challenges and prospects for elimination with special focus on the South Asian region. *Parasitology*, 145(4), 425–429.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182018000471>
37. Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
38. Oliveira, F. S., Valete-Rosalino, C. M., Pacheco, S. J., Costa, F. A., Schubach, A. O., & Pacheco, R. S. (2013). American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasites & vectors*, 6, 189.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-189>
39. Karimkhani, C., Wanga, V., Coffeng, L. E., Naghavi, P., Dellavalle, R. P., & Naghavi, M. (2016). Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(5), 584–591. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00003-7)
40. Marlow MA, Boité MC, Ferreira GEM, Steindel M, Cupolillo E (2014) Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(2): e2695. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002695>

41. Cavalcanti, D. P., & de Souza, W. (2018). The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*, 2018, 9603051. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>
42. Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology*, 49, 117–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001001>
43. Kocher, A., Valière, S., Bañuls, A. L., & Muriene, J. (2018). High-throughput sequencing of ADNk amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*, 145(5), 585–594. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002013>
44. Lukes, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic cell*, 1(4), 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>.
45. Cruz, I., Millet, A., Carrillo, E., Chenik, M., Salotra, P., Verma, S., Veland, N., Jara, M., Adai, V., Castrillón, C., Arévalo, J., Moreno, J., & Cañavate, C. (2013). An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 134(3), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.026>
46. Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and

- diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
47. Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Diotallevi, A., Andreoni, F., Fowler, H., Petersen, C., Vitale, F., & Magnani, M. (2017). The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania (L.) infantum* and *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasites & vectors*, 10(1), 239.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x>
48. Jara, M., Aduai, V., Valencia, B. M., Martinez, D., Alba, M., Castrillon, C., Cruz, M., Cruz, I., Van der Auwera, G., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J. C., & Arevalo, J. (2013). Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of clinical microbiology*, 51(6), 1826–1833. <https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13>
49. Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., & Magnani, M. (2014). Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PloS one*, 9(2), e88845.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845>
50. Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of Leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 11(1), 273. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
51. Adams, E. R., Gomez, M. A., Scheske, L., Rios, R., Marquez, R., Cossio, A., Albertini, A., Schallig, H., & Saravia, N. G. (2014). Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to

qPCR. *Parasitology*, 141(14),1891–1897.

<https://doi.org/10.1017/S0031182014001280>

52. Suárez, M., Valencia, B. M., Jara, M., Alba, M., Boggild, A. K., Dujardin, J. C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J., & Adai, V. (2015). Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7), e0003936. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003936>
53. Kariyawasam, R., Valencia, B. M., Lau, R., Shao, E., Thompson, C. A., Stevens, M., Kincaid, L., Del Castillo, A., Cruz-Arzapalo, L. O., Llanos-Cuentas, A., & Boggild, A. K. (2021). Evaluation of a point-of-care molecular detection device for *Leishmania* spp. and intercurrent fungal and mycobacterial organisms in Peruvian patients with cutaneous ulcers. *Infection*, 49(6), 1203–1211. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01673-y>
54. Kambouris ME, Siamoglou S, Kordou Z, et al. (2020). Point-of-need molecular processing of biosamples using portable instrumentation to reduce turnaround time. *Biosaf Health* 2, 177–182.
55. Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology*, 200(7), e00580-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
56. Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., Salvo, P., Bottai, D., Tavanti, A., & Di Francesco, F. (2021). Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. *Journal of*

pharmaceutical and biomedical analysis, 192, 113645.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113645>

57. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
58. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 1(6), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
59. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
60. Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>
61. Guk, K., Keem, J. O., Hwang, S. G., Kim, H., Kang, T., Lim, E. K., & Jung, J. (2017). A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA

- complex. *Biosensors & bioelectronics*, 95, 67–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.016>
62. Kaminski, M. M., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Zhang, F., & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. *Nature biomedical engineering*, 5(7), 643–656. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7>
63. Li, S. Y., Cheng, Q. X., Liu, J. K., Nie, X. Q., Zhao, G. P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell research*, 28(4), 491–493. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0022-x>
64. Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., Fedorova, I., Nakane, T., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2016). Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 165(4), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>
65. Yamano, T., Zetsche, B., Ishitani, R., Zhang, F., Nishimasu, H., & Nureki, O. (2017). Structural Basis for the Canonical and Non-canonical PAM Recognition by CRISPR-Cpf1. *Molecular cell*, 67(4), 633–645.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.035>
66. Swarts, D. C., van der Oost, J., & Jinek, M. (2017). Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, 66(2), 221–233.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.016>
67. Dong, D., Ren, K., Qiu, X., Zheng, J., Guo, M., Guan, X., Liu, H., Li, N., Zhang, B., Yang, D., Ma, C., Wang, S., Wu, D., Ma, Y., Fan, S., Wang, J., Gao, N., &

- Huang, Z. (2016). The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature17944>
68. Strohkendl, I., Saifuddin, F. A., Rybarski, J. R., Finkelstein, I. J., & Russell, R. (2018). Kinetic Basis for DNA Target Specificity of CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, 71(5), 816–824.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.043>
69. Cofsky, J. C., Karandur, D., Huang, C. J., Witte, I. P., Kuriyan, J., & Doudna, J. A. (2020). CRISPR-Cas12a exploits R-loop asymmetry to form double-strand breaks. *eLife*, 9, e55143. <https://doi.org/10.7554/eLife.55143>
70. Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
71. Ramachandran, A., & Santiago, J. G. (2021). CRISPR Enzyme Kinetics for Molecular Diagnostics. *Analytical chemistry*, 93(20), 7456–7464. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00525>
72. Nalefski, E. A., Patel, N., Leung, P., Islam, Z., Kooistra, R. M., Parikh, I., Marion, E., Knott, G. J., Doudna, J. A., Le Ny, A. M., & Madan, D. (2021). Kinetic analysis of Cas12a and Cas13a RNA-Guided nucleases for development of improved CRISPR-Based diagnostics. *iScience*, 24(9), 102996. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102996>

73. Singh, D., Mallon, J., Poddar, A., Wang, Y., Tippana, R., Yang, O., Bailey, S., & Ha, T. (2018). Real-time observation of DNA target interrogation and product release by the RNA-guided endonuclease CRISPR Cpf1 (Cas12a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(21), 5444–5449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718686115>
74. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
75. Alcántara, R., Peñaranda, K., Mendoza-Rojas, G., Nakamoto, J. A., Dueñas, E., Alvarez, D., Adai, V., & Milón, P. (2021). UnCovid: A versatile, low-cost, and open-source protocol for SARS-CoV-2 RNA detection. *STAR protocols*, *2*(4), 100878. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100878>
76. Zoepfel, J., Dwarakanath, S., Richter, H., Plagens, A., & Randau, L. (2012). Substrate generation for endonucleases of CRISPR/cas systems. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (67), 4277. <https://doi.org/10.3791/4277>
77. Jolany Vangah, S., Katalani, C., Booneh, H. A., Hajizade, A., Sijercic, A., & Ahmadian, G. (2020). CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Biological procedures online*, *22*, 22. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00135-3>
78. Fonfara, I., Richter, H., Bratovič, M., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, *532*(7600), 517–521. doi:10.1038/nature17945

79. Zhong, G., Wang, H., Li, Y., Tran, M. H., & Farzan, M. (2017). Cpf1 proteins excise CRISPR RNAs from mRNA transcripts in mammalian cells. *Nature chemical biology*, 13(8), 839–841. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2410>
80. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
81. Fuchs, R.T., Curcuru, J., Mabuchi, M., Yourik, P., and Robb, G.B. (2019). Cas12a *trans*-cleavage can be modulated *in vitro* and is active on *ss*DNA, *ds*DNA, and RNA. bioRxiv, 600890. <https://doi.org/10.1101/600890>
82. Swarts, D. C., & Jinek, M. (2019). Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Molecular cell*, 73(3), 589–600.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.021>
83. Jeon, Y., Choi, Y. H., Jang, Y., Yu, J., Goo, J., Lee, G., Jeong, Y. K., Lee, S. H., Kim, I. S., Kim, J. S., Jeong, C., Lee, S., & Bae, S. (2018). Direct observation of DNA target searching and cleavage by CRISPR-Cas12a. *Nature communications*, 9(1), 2777. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05245-x>
84. Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., & Arevalo, J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 49(3), 348–356. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.348>

85. Donner, A., & Eliasziw, M. (1992). A goodness-of-fit approach to inference procedures for the kappa statistic: confidence interval construction, significance-testing and sample size estimation. *Statistics in medicine*, *11*(11), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/sim.4780111109>
86. Sandoval-Juárez, A., Minaya-Gómez, G., Rojas-Palomino, N., & Cáceres, O. (2020). Identification of *Leishmania* species in patients derived to the National Institute of Health, Peru. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, *37*(1), 87–92. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4514>
87. Peng, D., & Tarleton, R. (2015). EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial genomics*, *1*(4), e000033. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000033>
88. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *23*(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
89. Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
90. Curtis, K. A., Morrison, D., Rudolph, D. L., Shankar, A., Bloomfield, L., Switzer, W. M., & Owen, S. M. (2018). A multiplexed RT-LAMP assay for

detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *Journal of virological methods*, 255, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.012>

91. Ooi, K. H., Liu, M. M., Tay, J., Teo, S. Y., Kaewsapsak, P., Jin, S., Lee, C. K., Hou, J., Maurer-Stroh, S., Lin, W., Yan, B., Yan, G., Gao, Y. G., & Tan, M. H. (2021). An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing. *Nature communications*, 12(1), 1739. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21996-6>
92. Khan, W. A., Barney, R. E., & Tsongalis, G. J. (2021). CRISPR-cas13 enzymology rapidly detects SARS-CoV-2 fragments in a clinical setting. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 145, 105019. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105019>
93. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech*. 1993 Jun;12(2):435-50. doi: 10.20506/rst.12.2.691.
94. Zimic M, Pajuelo M, Rueda D, López C, Arana Y, Castillo Y, Calderón M, Rodríguez S, Sheen P, Vinetz JM, Gonzales A, García HH, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Perú. (2009). Utility of a protein fraction with cathepsin L-Like activity purified from cysticercus fluid of *Taenia solium* in the diagnosis of human cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. 80(6):964-70.
95. Vallejo, A., Muniesa, A., Ferreira, C., & de Blas, I. (2013). New method to estimate the sample size for calculation of a proportion assuming binomial

- distribution. *Research in veterinary science*, 95(2), 405–409.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.005>
96. McHugh M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia medica*, 22(3), 276–282.
97. León, C. M., Muñoz, M., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A., Cubides, J. R., & Ramírez, J. D. (2017). Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six *Leishmania* Species DNA in Colombia. *Frontiers in microbiology*, 8, 1907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01907>
98. Disch, J., Pedras, M. J., Orsini, M., Pirmez, C., de Oliveira, M. C., Castro, M., & Rabello, A. (2005). *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 51(3), 185–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.10.005>
99. Oliveira, D. M., Lonardoní, M. V., Teodoro, U., & Silveira, T. G. (2011). Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15(3), 204–210.  
[https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70176-3](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70176-3)
100. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:363-82. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002051. PMID: 2825587.
101. Simpson, L., Douglass, S. M., Lake, J. A., Pellegrini, M., & Li, F. (2015). Comparison of the Mitochondrial Genomes and Steady State Transcriptomes

- of Two Strains of the Trypanosomatid Parasite, *Leishmania tarentolae*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7), e0003841. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003841>
102. Camacho, E., Rastrojo, A., Sanchiz, Á., González-de la Fuente, S., Aguado, B., & Requena, J. M. (2019). *Leishmania* Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles. *Genes*, 10(10), 758. <https://doi.org/10.3390/genes10100758>
103. Pita-Pereira, D., Lins, R., Oliveira, M. P., Lima, R. B., Pereira, B. A., Moreira, O. C., Brazil, R. P., & Britto, C. (2012). SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasites & vectors*, 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>
104. Castelli, G., Bruno, F., Reale, S., Catanzaro, S., Valenza, V., & Vitale, F. (2021). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Quantification of Parasite Load by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(7), 865. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070865>
105. Wu, Y., Tian, X., Song, N., Huang, M., Wu, Z., Li, S., Waterfield, N. R., Zhan, B., Wang, L., & Yang, G. (2020). Application of Quantitative PCR in the Diagnosis and Evaluating Treatment Efficacy of Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 581639. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.581639>
106. Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559–570. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559>

107. Eberhardt, E., Van den Kerkhof, M., Bulté, D., Mabile, D., Van Bockstal, L., Monnerat, S., Alves, F., Mbui, J., Delputte, P., Cos, P., Hendrickx, S., Maes, L., & Caljon, G. (2018). Evaluation of a Pan-*Leishmania* Spliced-Leader RNA Detection Method in Human Blood and Experimentally Infected Syrian Golden Hamsters. *The Journal of molecular diagnostics*, 20(2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.12.003>
108. Borst, A., Box, A. T., & Fluit, A. C. (2004). False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23(4), 289–299. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1100-1>
109. Lamm, R., Alves, C., Perrotta, G., Murphy, M., Messina, C., Sanchez, J. F., Perez, E., Rosales, L. A., Lescano, A. G., Smith, E., Valdivia, H., Fuhrer, J., & Ballard, S. B. (2018). Prevalence of and Factors Associated with Negative Microscopic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Rural Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 99(2), 331–337. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0909>
110. Blaizot, R., Simon, S., Ginouves, M., Prévot, G., Blanchet, D., Ravel, C., Couppie, P., Demar, M., & Nabet, C. (2021). Validation of Swab Sampling and SYBR Green-Based Real-Time PCR for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana. *Journal of clinical microbiology*, 59(2), e02218-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02218-20>
111. Cantanhêde, L. M., Mattos, C. B., Cruz, A. K., Ikenohuchi, Y. J., Fernandes, F. G., Medeiros, E., da Silva-Júnior, C. F., Cupolillo, E., Ferreira, G., &

- Ferreira, R. (2021). Overcoming the Negligence in Laboratory Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(9), 1116. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091116>
112. Adams, E. R., Gomez, M. A., Scheske, L., Rios, R., Marquez, R., Cossio, A., Albertini, A., Schallig, H., & Saravia, N. G. (2014). Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology*, 141(14),1891–1897. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001280>
113. Boggild, A. K., Valencia, B. M., Espinosa, D., Veland, N., Ramos, A. P., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., & Low, D. E. (2010). Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(1), e1–e6. <https://doi.org/10.1086/648730>
114. Tirelli, F., Vernal, S., & Roselino, A. M. (2017). Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross-sectional study. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(5), 642–648. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175794>
115. Ding, R., Long, J., Yuan, M., Zheng, X., Shen, Y., Jin, Y., Yang, H., Li, H., Chen, S., & Duan, G. (2021). CRISPR/Cas12-Based Ultra-Sensitive and Specific Point-of-Care Detection of HBV. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4842. <https://doi.org/10.3390/ijms22094842>

116. Ibarra-Meneses, A. V., Cruz, I., Chicharro, C., Sánchez, C., Biéler, S., Broger, T., Moreno, J., & Carrillo, E. (2018). Evaluation of fluorimetry and direct visualization to interpret results of a loop-mediated isothermal amplification kit to detect *Leishmania* DNA. *Parasites & vectors*, *11*(1), 250. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2836-2>
117. Dixit, K. K., Ramesh, V., Gupta, R., Negi, N. S., Singh, R., & Salotra, P. (2021). Real-Time Fluorimetry Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Leishmaniasis and as a Tool for Assessment of Cure for Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *104*(6), 2097–2107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1057>

## **XII. Anexos**

### **Anexo 1**

#### 1. Buffer 10X de la enzima Cas12a

- a. Se pesó 0.1952 g de Tris-HCl (Cf = 100 mM), 0.092 g de Tris-base y 0.5844 g de NaCl (Cf = 500 mM) y se disolvió estas sales en el 70% del volumen final en agua libre de nucleasas (grado biología molecular).
- b. Ajustar el pH hasta pH 7.9 (a 25° C).
- c. Enrasar hasta el volumen de 20 mL.
- d. Filtrar la solución utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm.
- e. Preparar alícuotas de 1 mL en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL.
- f. Almacenar a -20°C.

#### 1.2. Solución 2 mg/mL de BSA (stock de trabajo)

- a. Disolver 40 mg de BSA (albúmina de suero bovino liofilizado, marca Sigma-Aldrich, Cat # A9418-100G) en 20 mL de agua libre de nucleasas.
- b. Filtrar utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm.
- c. Preparar alícuotas de 1 mL en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL.
- d. Almacenar a -20°C.

#### 1.3. Solución 1M de MgCl<sub>2</sub> (stock de trabajo)

- a. Disolver 2 g de MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio hexahidratado, marca Supelco, Cat # 105833) en 10 mL de agua libre de nucleasas.
- b. Preparar alícuotas de 1 mL en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL.
- c. Almacenar a -20°C.

## Anexo 2

### Oligonucleótidos de los cebadores, crARN y sonda reportera utilizados en este estudio

ID	*Secuencia 5' - 3'	Descripción	Referencia
kDNA_crARN	TAATACGACTCACTATAGGtaat ttctactaagttagatAACGGGGTTTC TGTATGCCA	molde de <i>dsDNA</i> para generar el crARN específico del ADNk por transcripción <i>in vitro</i>	Este estudio
RNaseP_crARN	TAATACGACTCACTATAGGtaat ttctactaagttagatAATTACTTGGG TGTGACCCT	molde de <i>dsDNA</i> para generar el crARN específico de ARNasa P por transcripción <i>in vitro</i>	Broughton <i>et al.</i> (2020)
kDNA_F1	TAGGGGCGTTCTGCG	cebador <i>forward</i> ADNk	Este estudio
kDNA_R	CCACTATATTACACCAACCCC	cebador <i>reverse</i> ADNk	Este estudio
MPL1_F	TACTCCCCGACATGCCTCTG	cebador <i>forward</i> ADNk	López <i>et al.</i> (1993)
RNaseP_F	ACTCAGCCATCCACATCC	cebador <i>forward</i> ARNasa P	Alcántara <i>et al.</i> (2021)
RNaseP_R	CACCCTCAATGCAGAGTC	cebador <i>reverse</i> ARNasa P	Curtis <i>et al.</i> (2018)
Reporter_FQ	Cy3/TTATT/BHQ2	sonda reportera <i>ssDNA</i>	Este estudio

\*en el caso de los moldes de *dsDNA* para generar los crARNs, la secuencia comprende (de izquierda a derecha): secuencia del promotor T7 (en color rojo), secuencia *scaffold* del crARN (letras minúsculas) y el ARN guía (en color azul).

### Conjunto de cebadores para la amplificación del biomarcador ADNk y ARNasa P

Nombre	Código	Secuencia	Producto esperado
ADNk-Par 1	kDNA_F1	TAGGGGCGTTCTGCG	116 pb
	kDNA_R	CCACTATATTACACCAACCCC	
ADNk-Par 2	MPL1_F	TACTCCCCGACATGCCTCTG	138 pb
	kDNA_R	CCACTATATTACACCAACCCC	
ARNasa P	RNaseP_F	ACTCAGCCATCCACATCC	175 pb
	RNaseP_R	CACCCTCAATGCAGAGTC	

### Anexo 3: Mix para amplificación por PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por rx ( $\mu\text{L}$ )	Volumen para 15 rx ( $\mu\text{L}$ )
Master Mix de PCR <i>DreamTaq Green</i>	2X	1X	12.5	187.5
Cebador <i>forward</i>	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	0.5	7.5
Cebador <i>reverse</i>	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	0.5	7.5
Agua grado PCR	-	-	6.5	97.5
Volumen final			20	300

#### Anexo 4: Condiciones de ciclado de la reacción de PCR de punto final

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95°C	2 min	1
Denaturación	95°C	20 s	45
Hibridación	61°C	30 s	
Extensión	68°C	15 s	
Extensión final	68°C	5 min	1

### Anexo 5: Preparación del complejo CRISPR 10X

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por rx ( $\mu\text{L}$ )	Volumen para 16 rx ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 1X de la enzima Cas12a sin $\text{MgCl}_2$	-	-	8.888	142.22
<i>Refolded</i> crARN de ADNk	3.65 $\mu\text{M}$	0.15 $\mu\text{M}$	0.411	6.58
Enzima Cas12a	2 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.5	8
Sonda reportera Cy3/TTATT/BHQ2	100 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	0.2	3.2
Volumen final				160

## **Anexo 6: Parámetros configurados en el equipo lector de fluorescencia Synergy**

General	
Tipo de placa	Seleccionar la placa respectiva
Temperatura	25°C
Paso de cinética	
Tiempo de corrida	Colectar la data de fluorescencia por 120 min y analizar a los 20 min (ADNk), 10 min (ARNasa P) según el biomarcador
Intervalo	1 min
Método de lectura	Método de detección: intensidad de fluorescencia
Tipo de lectura	Endpoint/Kinetic
Tipo de óptica	Monocromadores
Excitación (nm)	520
Emisión (nm)	570
<i>Gain</i>	120
<i>Read height</i>	6.25 mm