

## Detección de especies de *Leishmania* (*Viannia*) empleando la plataforma CRISPR/Cas12a

### Detection of *Leishmania* (*Viannia*) species using the CRISPR/Cas12a platform

Eva Dueñas Villavicencio<sup>1</sup>, Percy Huaihua Puma<sup>2</sup>, Jorge Arévalo Zelada<sup>2</sup>, Vanessa Adauí Siche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biomoléculas-Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, <sup>2</sup>Laboratorio de Patho-antígenos-Universidad Peruana Cayetano Heredia

#### Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad desatendida causada por parásitos protozoos del género *Leishmania* y transmitida por insectos vectores del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Las infecciones por *Leishmania braziliensis* son predominantes en América Latina y pueden generar lesiones cutáneas y mucosas. El diagnóstico temprano y preciso de leishmaniosis es necesario para un tratamiento eficaz. Las principales pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico tienen una alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, entre sus desventajas se encuentran su alto costo, tiempo de procesamiento y se requiere de centros especializados para su ejecución (Akhoundi et al., 2017). En la última década se han propuesto nuevas tecnologías de diagnóstico molecular que se dirigen a ensayos con potencial aplicación en el punto de atención del paciente. Destaca la plataforma basada en los sistemas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas)-Cas, que es un método molecular novedoso aplicado a la detección de agentes patógenos. Chen y colaboradores demostraron su aplicación en la detección del virus del papiloma humano en muestras clínicas. La prueba consiste en un paso de amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa seguido del reconocimiento de la secuencia diana por un complejo ribonucleico conformado por un ARN guía y la endonucleasa Cas12a. Este complejo produce un corte específico de la secuencia de ADN diana, proceso que desencadena la actividad colateral indiscriminada de la enzima Cas12a. Esto permite escindir una sonda reportera que emite una señal fluorescente medible (Chen et al., 2018). Los reportes que aplican este método se han incrementado durante la pandemia de COVID-19, ya que se utilizó esta tecnología en la detección del agente causal, el virus SARS-CoV-2 (Broughton et al., 2020). El presente trabajo tuvo como objetivo optimizar y evaluar el sistema CRISPR-Cas12a como potencial método de detección molecular del subgénero *Viannia* de *Leishmania* que incluye las especies patógenas para el ser humano predominantes en América Latina. Para tal fin, se seleccionó como diana multicopia al ADN de minicírculos del kinetoplasto (ADNk), en particular una región conservada en especies de *Leishmania* (*Viannia*). Se optimizó el ensayo considerando un paso de amplificación por PCR convencional seguido de la detección con CRISPR-Cas12a. Para la evaluación de la sensibilidad analítica se utilizó ADN genómico extraído de la cepa de referencia de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 para construir una curva de equivalentes genómicos de parásitos (e.g.p) (Jara et al., 2013). La evaluación de la especificidad analítica incluyó cepas de referencia de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. El ensayo PCR/CRISPR-Cas12a logró detectar  $5 \times 10^{-2}$  e.g.p, similar a lo obtenido por PCR en tiempo real (prueba de referencia). Además, nuestra herramienta basada en Cas12a permitió la detección específica del subgénero *Viannia* de *Leishmania* y no mostró reacción cruzada con ADN humano o de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Hemos iniciado la evaluación del desempeño del método PCR/CRISPR en muestras clínicas en comparación con la PCR en tiempo real. Los resultados preliminares apoyan la aplicabilidad de la detección basada en CRISPR para fines de diagnóstico de primera línea de infección por *Leishmania* a nivel del subgénero *Viannia*.

**Palabras clave:** Leishmaniosis cutánea, *Leishmania*, subgénero *Viannia*, ADNk, detección molecular, CRISPR-Cas12a.

#### Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and transmitted by insect vectors of the genus *Lutzomyia* in the New World. *Leishmania braziliensis* infections are predominant in Latin America and can cause skin and mucosal lesions. Early and accurate diagnosis of leishmaniasis is necessary for effective treatment. The main molecular tests used in diagnosis have high sensitivity and specificity; however, their disadvantages include high cost, processing time and the need of specialized centers for their execution (Akhoundi et al., 2017). In the last decade, new molecular diagnostic technologies have been proposed that are aimed at tests with potential application at the point of care. The platform based on CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas systems stands out, which is a novel molecular method applied to the detection of pathogens. Chen et al. demonstrated its application in the detection of human papillomavirus in clinical samples. The test consists of a first step of isothermal amplification with recombinase and polymerase followed by the recognition of the target sequence by a ribonucleic complex made up of a guide RNA and the Cas12a endonuclease. This complex produces a specific cut of the target DNA sequence, a process that triggers the indiscriminate collateral activity of the Cas12a enzyme. This allows a reporter probe to be cleaved, thereby emitting a measurable fluorescent signal (Chen et al., 2018). The papers that apply this detection method have increased during the COVID-19 pandemic, since this technology was used to detect the causative agent, the SARS-CoV-2 virus (Broughton et al., 2020).

The present work aimed to optimize and evaluate the CRISPR-Cas12a system as a potential molecular detection method of the *Viannia* subgenus of *Leishmania* that includes the predominant human pathogenic species in Latin America. For this purpose,

## LIBRO DE RESÚMENES

kinetoplast minicircle DNA (kDNA) was selected as a multicopy target, in particular a region conserved in *Leishmania* (*Viannia*) species. The assay was optimized considering a first step of conventional PCR amplification, followed by detection with the CRISPR-Cas12a system. For the evaluation of the analytical sensitivity, genomic DNA extracted from the reference strain of *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 was used to construct a curve of parasite genomic equivalents (p.g.e) (Jara et al., 2013). In the evaluation of the analytical specificity, reference strains of the *Viannia* and *Leishmania* subgenera were used. The PCR/CRISPR-Cas12a assay could detect  $5 \times 10^{-2}$  p.g.e, similar to that obtained by real-time PCR (reference test). In addition, our Cas12a-based tool allowed the specific detection of the subgenus *Viannia* of *Leishmania* and did not show cross-reaction with human DNA or *Trypanosoma cruzi* strain Y DNA. We have started the performance evaluation of the PCR/CRISPR method in clinical samples compared to real-time PCR. Preliminary results support the applicability of CRISPR-based detection for first-line diagnostic purposes of *Leishmania* infection at the *Viannia* subgenus level.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania*, *Viannia* subgenus, kDNA, molecular detection, CRISPR-Cas12a.

### Referencias Bibliográficas:

- [1] 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>
- [2] 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>
- [3] 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>
- [4] Jara, M., Adauí, V., Valencia, B. M., Martínez, 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>

### Email:

<sup>1</sup>eva.duenas@upch.pe

<sup>2</sup>percy.huaihua@upch.pe

<sup>3</sup>jorge.arevalo@upch.pe

<sup>4</sup>vanessa.adaui@upc.edu.pe