Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Unidad de Posgrado

Implementación de la técnica CRISPR-Cas12a combinada con LAMP para la detección molecular de *Leishmania* spp. (Protista: Trypanosomatida: Trypanosomatidae)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Ingrid Amanda TIRADO JULCA

ASESOR

Dra. Liz Erika CRUZ PIO

Dra. Vanessa Karina ADAUI SICHERI (Coasesor)

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Tirado, I. (2026). *Implementación de la técnica CRISPR-Cas12a combinada con LAMP para la detección molecular de Leishmania spp. (Protista: Trypanosomatida: Trypanosomatidae)*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Ingrid Amanda Tirado Julca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72789873
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2394-7040
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dra. Liz Erika Cruz Pio
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41509033
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8226-7440
Datos de co-asesor	
Nombres y apellidos	Dra. Vanessa Karina Adaui Sicheri
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10280437
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8516-006X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dr. Juan Atilio Jiménez Chunga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06281952
Nombres y apellidos	Mg. Rosa Nérida Martínez Rojas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	8426698
Nombres y apellidos	Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	6183797
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Obligatorio. Nombres y apellidos completos según aparecen en el documento de identidad. No debe registrar los de nombres asesores, directores de escuela o unidades de posgrado. Este campo es solo para miembros de jurado.
Tipo de documento	Obligatorio. Elegir un solo tipo de documento: DNI, Carné de extranjería emitido en Perú, Pasaporte, Cédula de identidad
Número de documento de identidad	Obligatorio. Usar solo un número de identificación según corresponda. En el caso de jurados extranjeros con pasaporte o cédula de identidad, anteponer el código ISO-3166 de país al número de documento de identidad y separar ambos datos mediante una barra lateral: BR / AB000421 CO / 9955249956
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.1.2
Grupo de investigación	Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC)
Agencia de financiamiento	Marco del fondo interno C-004-2025 de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). PROCIENCIA–CONCYTEC mediante el contrato N.° PE501084865-2023.
Ubicación geográfica de la investigación	Av Alameda San Marcos 11, Chorrillos 15067. Latitud: -12.19758965 Longitud: -77.0082777426229
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023-2025
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01

Expediente N.º 265-UPG-FCB-2026

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las 14:00 horas del miércoles 14 de octubre de 2026, en el aula 230 de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis conformado por:

Dr. Juan Atilio Jiménez Chunga	(Presidente)
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	(Miembro)
Mg. Rosa Nérida Martínez Rojas	(Miembro)
Dra. Liz Erika Cruz Pio	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller **INGRID AMANDA TIRADO JULCA.**

Después de darse lectura al **Expediente N.º 295-UPG-FCB-2026,** en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

"Implementación de la técnica CRISPR-Cas12a combinada con LAMP para la detección molecular de *Leishmania* spp. (Protista: Trypanosomatida: Trypanosomatidae)", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la deliveración la que dio como resultado el calificativo de: Excelente..... con la nota de Diecinueve (19)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, a la Bachiller **INGRID AMANDA TIRADO JULCA.**

Siendo las 15:35..... se levantó la sesión, recibiendo la graduanda las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el miércoles 14 de octubre del año 2026

Dr. Juan A. Jiménez Chunga
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE
jjimenezc@unmsm.edu.pe

Dra. Liz Erika Cruz Pio
Profesora Asociado a T.C.
ASESORA
lcruzp1@unmsm.edu.pe
RENACYT P0043932

Dr. Pablo S. Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO
pramirezr@unmsm.edu.pe
RENACYT P0001952

Mg. Rosa N. Martínez Rojas
Profesora Principal a D.E..
MIEMBRO
rmartinezr@unmsm.edu.pe
RENACYT P0016108

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Liz Erika Cruz Pio en mi condición de asesora acreditado mediante Dictamen de la UPG N.º 000110-2026-UPG-VDIP-FCB/UNMSM de la tesis, cuyo título es **"Implementación de la técnica CRISPR-Cas12a combinada con LAMP para la detección molecular de *Leishmania* spp. (Protista: Trypanosomatida:Trypanosomatidae)".,** presentado por la Bachiller **INGRID AMANDA TIRADO JULCA** para optar el grado académico de Magíster en **Biología Molecular.**

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **5%** de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado académico de Magíster en Biología Molecular.

Lima, 19 de octubre de 2026

UNMSM
Firmado digitalmente por CRUZ PIO Liz Erika FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.10.2026 16:41:01 -05:00

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: **DRA. LIZ ERIKA CRUZ PIO**

DNI: **41509033**

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis asesoras de tesis, la Dra. Vanessa Adaui, profesora e investigadora de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), por su guía, apoyo, paciencia, dedicación y valiosos consejos durante el desarrollo de este trabajo; y a la Dra. Liz Cruz, docente investigadora de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), por su constante orientación, compromiso y dedicación a lo largo de este proceso. Sus conocimientos, observaciones y experiencia fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

Asimismo, quiero agradecer a la Dirección de Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), por el financiamiento brindado en el marco del fondo interno C-004-2025, el cual fue necesario para el desarrollo de esta investigación. Del mismo modo, agradezco a PROCIENCIA–CONCYTEC por el financiamiento otorgado mediante el contrato N.° PE501084865-2023, gracias al cual pude culminar mis estudios de maestría y concretar el presente trabajo.

Mi reconocimiento también a los investigadores colaboradores: al Dr. Jorge Arévalo, del Laboratorio de Patho-antígenos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH); a las Dras. María Cruz, de la Universidad Andina del Cusco, y María Antonieta Quispe, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por los valiosos intercambios de conocimientos durante el desarrollo de la publicación científica y por el aporte de muestras clínicas de gran valor. Asimismo, agradezco a las Dras. Edith Málaga y Manuela Verástegui, al Dr. Daniel Guerra (UPCH) y al Dr. Carlos Restrepo, del Centro de Biología Molecular y Celular de Enfermedades del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP, Panamá), por el aporte de muestras de referencia y material biológico de gran relevancia para el desarrollo de esta investigación.

A mi universidad, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarme una formación académica sólida y fomentar en mí una visión de la ciencia con compromiso social, que ha contribuido significativamente a mi desarrollo profesional y personal.

Finalmente, agradezco profundamente a mi familia y amigos por su apoyo constante, paciencia y motivación durante esta importante etapa de mi formación profesional.

DEDICATORIA

Para todos aquellos que persisten.

CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Aspectos generales de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA)	5
2.2 Situación de la LTA en el Perú	5
2.3 Biomarcadores para la detección molecular de *Leishmania* spp.	7
2.3.1 ADN del kinetoplasto (kDNA): ADN de minicírculos del kinetoplasto	7
2.3.2 Gen 18S rDNA	7
2.4 Métodos alternativos para la extracción de ADN en muestras clínicas de leishmaniasis	8
2.5 Diagnóstico molecular de LTA	8
2.6 Técnica de amplificación "*Loop-mediated isothermal amplification*" (LAMP)	10
2.7 Enzima polimerasa para la reacción de LAMP *Bst* de *Geobacillus stearothermophilus*	12
2.8 Tecnología CRISPR-Cas12a	13
III. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Aspectos éticos	15
4.2 Material biológico	15
4.3 Producción local (*in house*) de la proteína recombinante ADN polimerasa Bst-LF	18
4.3.1 Generación de cepas transformantes de *E. coli* BLR(DE3)	18
4.3.2 Expresión y purificación de la proteína ADN polimerasa Bst-LF	19
4.4 Análisis *in silico* de la especificidad de cebadores de LAMP y del crRNA	22
4.5 Obtención del crARN (CRISPR ARN) dirigido a kDNA y al gen 18S rDNA	23
4.6 Estandarización y análisis de amplificación del ADN diana con la técnica LAMP	23
4.7 Optimización y validación analítica de los ensayos LAMP-CRISPR mediante lecturas de fluorescencia	27

4.8 Optimización analítica de los ensayos LAMP-CRISPR mediante lecturas LFA 28
4.9 Sensibilidad y especificidad analítica del ensayo LAMP-CRISPR 29
4.10 Extracción de ADN de muestras clínicas mediante el dispositivo S-TECH 30
4.11 Estimación de la carga parasitaria en muestras clínicas mediante qPCR 31
4.12 Evaluación del panel de muestras clínicas mediante LAMP-CRISPR 31
4.13 Análisis y procesamiento de la data del ensayo LAMP-CRISPR 32
V. RESULTADOS 34
5.1 Producción local (*in house*) de la enzima recombinante ADN polimerasa Bst-LF en la cepa de *E. coli* BLR(DE3) 34
5.1.1 Obtención de colonias recombinantes que expresan la enzima Bst-LF ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus* 34
5.1.2 Expresión analítica de la proteína Bst-LF ADN polimerasa de *G. stearothermophilus* 34
5.1.3 Expresión y purificación de la proteína Bst-LF de *G. stearothermophilus* a escala preparativa 36
5.2 Optimización y validación analítica de la reacción LAMP-CRISPR 37
5.2.1 Estandarización de los tiempos de incubación de la reacción LAMP 37
5.2.2 Determinación de la concentración de Bst-LF polimerasa recombinante para la reacción LAMP 39
5.2.3 Optimización de la concentración de $MgSO_4$ 40
5.2.4 Estandarización de lecturas de sonda fluorescente 41
5.3 Optimización de los ensayos LAMP-CRISPR en el formato de LFA (Lateral Flow Assay) 42
5.4 Análisis de sensibilidad analítica para los marcadores kDNA y 18S rDNA 44
5.5 Análisis de especificidad analítica de los ensayos LAMP-CRISPR 46
5.6 Evaluación del desempeño de los ensayos LAMP-CRISPR en muestras clínicas 47
VI. DISCUSIÓN 54
6.1 Obtención y validación de la enzima recombinante Bst-LF ADN polimerasa 54
6.2 Optimización del ensayo LAMP 56
6.3 Desempeño analítico del ensayo LAMP-CRISPR para la detección de *Leishmania* spp. 58
6.4 Adaptación del sistema LAMP-CRISPR hacia un formato portátil 61
6.5 Desempeño clínico de la prueba LAMP-CRISPR de muestras no invasivas 62

6.6 Evaluación del potencial diagnóstico clínico del flujo de trabajo propuesto para la detección molecular de *Leishmania* spp. 65
6.7 Perspectivas y limitaciones del estudio 68
VII. CONCLUSIONES 72
VIII. RECOMENDACIONES 73
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74
X. ANEXOS 90
XI. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA 95

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
kDNA	ADN del kinetoplasto
rDNA	ADN ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	ARN ribosomal
Cas	Proteínas asociadas al sistema CRISPR
crRNA	ARN CRISPR
LAMP	Amplificación isotérmica mediada en lazo
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
NAAT	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, por sus siglas en inglés
OPS	Organización Panamericana de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
PoC	Punto de atención (del inglés, *point-of-care*)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de punto final
PKDL	Leishmaniasis dérmica post-kala-azar
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RPA	Amplificación por recombinasa y polimerasa
ssDNA	ADN de cadena simple

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). 11

Figura 2. Obtención de muestras de lesiones cutáneas y mucosas de pacientes con casos presuntivos de leishmaniasis. 16

Figura 3. Representación esquemática del proceso de expresión y purificación local (*in house*) de la enzima recombinante Bst-LF ADN polimerasa. 21

Figura 4. Ubicación de los cebadores LAMP y del sitio diana del crRNA en la región genómica del marcador kDNA. 25

Figura 5. Ubicación de las secuencias de los cebadores de LAMP y del sitio diana del crRNA en la región genómica del marcador 18S rDNA. 26

Figura 6. Esquema de las etapas de implementación y evaluación de la técnica LAMP-CRISPR aplicada a la detección molecular de *Leishmania* spp**.** 33

Figura 7. Análisis de la expresión de la proteína Bst-LF mediante SDS-PAGE. 35

Figura 8. Proceso de purificación por cromatografía de afinidad NTA-Ni/His-Tag en gel SDS-PAGE al 12,5%. 36

Figura 9. Optimización del tiempo de incubación de la reacción LAMP. 38

Figura 10. Curva de estandarización de la concentración enzimática para la reacción LAMP utilizando la diana kDNA de *Leishmania* spp. 39

Figura 11. Curvas de concentración de $MgSO_4$ para la amplificación de las dianas kDNA y 18S de *Leishmania* spp. 41

Figura 12. Comparación de sonda fluorescente para el sistema LAMP-CRISPR. Se presentan las razones de fluorescencia (ratios S/NTC) durante 60 minutos. 42

Figura 13. Optimización de ensayos de detección basados en CRISPR utilizando lectura por flujo lateral (LFA). 43

Figura 14. Determinación de la sensibilidad analítica de los ensayos LAMP–CRISPR para la detección de *Leishmania* spp. 45

Figura 15. Especificidad analítica de los ensayos LAMP-CRISPR. Evaluación del panel de 17 muestras de ADN de referencia de diversos patógenos y controles. 47

Figura 16. Análisis de concordancia del panel clínico. Comparación de resultados entre los ensayos qPCR-kDNA y LAMP–CRISPR dirigidos a los marcadores kDNA y 18S rDNA en 17 muestras. 49

Figura 17. Análisis de concordancia de las muestras clínicas en función de la carga parasitaria (e.g.p/µg), del subgrupo de muestras que resultaron detectadas y cuantificables por qPCR dirigida al marcador kDNA. 50

Figura 18. Evaluación de LAMP–CRISPR-kDNA y 18S en muestras clínicas mediante flujo lateral. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Especies de *Leishmania* spp. reportadas en Perú 6

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas en este trabajo 18

Tabla 3. Resultados de las 17 muestras clínicas evaluadas mediante ensayos de qPCR, y LAMP–CRISPR para la detección molecular de *Leishmania* spp. (1: positivo, 0: negativo). NC**: muestra clasificada como detectada pero no cuantificable. *Y: concordancia; N: no concordancia. 51

Tabla 4. Análisis de concordancia para la detección de *Leishmania* spp. entre el ensayo LAMP-CRISPR y la prueba molecular de referencia qPCR dirigida al marcador kDNA. APP: acuerdo positivo porcentual; ANP: acuerdo negativo porcentual. 52

RESUMEN

Actualmente, el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) se basa principalmente en métodos convencionales, como la microscopía, y en la detección molecular mediante PCR de punto final. No obstante, su adopción en establecimientos de salud de zonas rurales con recursos limitados se mantiene restringida. En este contexto, investigaciones recientes buscan desarrollar estrategias basadas en técnicas moleculares de nueva generación que permitan optimizar la sensibilidad, simplificar el flujo de trabajo, disminuir los costos y facilitar su implementación en regiones endémicas.

En este estudio se desarrolló un ensayo molecular que combina la amplificación isotérmica mediada por LAMP con la detección basada en la tecnología CRISPR–Cas12a. El ensayo se dirige a dos marcadores multicopia: regiones conservadas del ADN del kinetoplasto (kDNA; minicírculos) y del gen ADN ribosomal 18S (18S rDNA), analizados de manera independiente. Asimismo, se implementó el uso de proteínas recombinantes producidas localmente (*in house*) y el flujo de trabajo se adaptó para la lectura por fluorescencia y para un formato visual y portátil mediante tiras de flujo lateral (LFA). El ensayo LAMP-CRISPR mostró alta sensibilidad analítica para ambos marcadores (0,05 equivalentes genómicos de parásito por reacción) y permitió detectar el subgénero *Viannia* (kDNA) y a nivel pan-*Leishmania* (18S rDNA), sin evidenciar reactividad cruzada con ADN de los patógenos de referencia evaluados ni con ADN humano.

Adicionalmente, se evaluó un panel de muestras clínicas obtenidas por método no invasivo (papel filtro) de lesiones cutáneas (n=8) y mucosas (n=5), con controles endémicos (n=4) provenientes de las regiones de Madre de Dios y Cusco clasificados por PCR convencional y evaluación clínica. De las muestras detectadas por qPCR dirigida a kDNA (n=14), el ensayo LAMP-CRISPR kDNA mostró una mayor concordancia (8/14) en comparación al marcador 18S (4/14), principalmente en muestras provenientes de lesiones clasificadas como activas. Las discrepancias se concentraron en muestras clasificadas como curadas con Cq tardíos (≥30) y de carga parasitaria de baja a moderada. La concordancia entre formatos de lectura (fluorescencia y LFA) respalda la factibilidad de adaptar LAMP-CRISPR a sistemas portátiles. No obstante, al encontrarse en fase de prueba de concepto, se requiere continuar con la optimización y validación clínica antes de escalar su implementación en campo.

Palabras clave: leishmaniasis tegumentaria americana, *Leishmania* spp., muestras no invasivas, LAMP, CRISPR-Cas12a.

ABSTRACT

Currently, the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL) relies primarily on conventional methods, such as microscopy and molecular detection by end-point PCR. However, their adoption in rural health facilities with limited resources remains restricted. In this context, recent research aims to develop strategies based on next-generation molecular techniques to improve sensitivity, simplify workflows, reduce costs, and facilitate implementation in endemic regions.

In this study, a molecular assay combining LAMP isothermal amplification with CRISPR–Cas12a-based detection was developed. The assay targets two multicopy markers: conserved regions of kinetoplast DNA (kDNA; minicircles) and the 18S ribosomal DNA gene (18S rDNA), analyzed independently. In-house recombinant proteins were used, and the workflow was adapted for fluorescence readout and a portable visual format using lateral flow assay (LFA) strips. The LAMP-CRISPR assay demonstrated high analytical sensitivity for both markers (0,05 parasite genome equivalents per reaction), detecting the *Viannia* subgenus (kDNA) and allowing pan-*Leishmania* detection (18S rDNA). No cross-reactivity was observed with DNA from the reference pathogens evaluated or with human DNA.

Furthermore, a panel of clinical samples collected by a non-invasive method (filter paper) from cutaneous (n=8) and mucosal (n=5) lesions, along with endemic controls (n=4) from Madre de Dios and Cusco regions, classified by conventional PCR and clinical evaluation, was assessed. Among samples detected by kDNA-targeted qPCR (n=14), the kDNA LAMP-CRISPR assay showed higher concordance (8/14) than the 18S target (4/14), particularly in samples classified as active infection lesions. Discrepancies were observed in clinically cured lesion samples, which exhibited late Cq values (≥ 30) and moderate-to-low parasite loads. Agreement between readout formats (fluorescence and LFA) supports the feasibility of adapting LAMP-CRISPR to portable systems. However, as the assay is currently in the proof-of-concept phase, further optimization and clinical validation are required before its implementation as a near point-of-care molecular diagnostic.

Keywords: American Cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania spp*., non-invasive samples, LAMP, CRISPR-Cas12a

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una de las enfermedades infecciosas desatendidas más graves, con una incidencia estimada de entre 0.7 y 1 millón de casos nuevos cada año y entre 20 000 y 30 000 muertes (OMS, 2023; OPS, 2023). Al ser una enfermedad transmitida por vectores, la leishmaniasis representa una amenaza persistente para millones de personas en regiones endémicas de Asia, África, la cuenca del Mediterráneo y las Américas (Alvar et al., 2012).

Esta enfermedad es causada por un protozoario parásito del género *Leishmania*, del cual se han identificado alrededor de 22 especies patógenas para el ser humano. Estas especies se clasifican tradicionalmente en dos subgéneros: *L*. (*Leishmania*) y *L*. (*Viannia*) (OPS, 2012), aunque recientemente se ha reconocido también al subgénero *L*. (*Mundinia*) como patógeno en humanos (Preativanyou et al., 2024; Yao 2020; Sereno 2019). En la región de las Américas (Centroamérica y Sudamérica), predominan las especies neotropicales del subgénero *L*. (*Viannia*) (Llanes et al., 2015; Lainson, 1987), las cuales están estrechamente vinculadas con la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), manifestándose principalmente en sus formas cutánea y mucosa (Reithinger & Dujardin, 2007).

Las manifestaciones clínicas de la LTA presentan notable variabilidad entre pacientes según la especie de *Leishmania* involucrada; de hecho, una misma especie puede inducir lesiones con características distintas en un mismo individuo (Aoun & Bouratbine, 2014; Pearson & de Queiroz Sousa, 1996). Este polimorfismo clínico está determinado por una compleja interacción de factores, entre los que destacan la virulencia intrínseca de la especie del parásito y factores determinantes del hospedero humano, tales como su constitución genética y el perfil de respuesta inmune (Carvalho et al., 2015; Jirmanus et al., 2012; Reithinger et al., 2007).

Diversas especies del subgénero *Viannia* como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* están asociadas al desarrollo de lesiones mucosas, que conllevan una elevada morbilidad y, en casos excepcionales, mortalidad (Llanes et al., 2015). Ante el riesgo de progresión de las formas cutáneas a leishmaniasis mucosa, la detección temprana

de infecciones causadas por este subgénero resulta crítica (Costa et al., 1986). Por otro lado, la identificación precisa a nivel de subgénero y especie es fundamental para orientar la toma de decisiones terapéuticas y así evitar la exposición innecesaria a fármacos antileishmaniales (Burza et al., 2018; Kurizky et al., 2018; García et al., 2005).

Adicionalmente, en el diagnóstico de rutina, las técnicas moleculares se encuentran implementadas de manera complementaria a los métodos parasitológicos en hospitales nacionales y centros de investigación. En particular, las metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y su variante en tiempo real (qPCR) permiten confirmar la infección por *Leishmania* con alta sensibilidad y apoyar la identificación específica a distintos niveles taxonómicos, contribuyendo a un mejor manejo terapéutico (Wu et al., 2020; Gow et al., 2022). Debido a su robustez, la PCR se ha consolidado como una prueba ampliamente utilizada en estudios de diagnóstico molecular de leishmaniasis (Boggild et al., 2010; Gomes et al., 2014; Weigle, 2002), mientras que la qPCR ha facilitado aproximaciones cuantitativas esenciales para el seguimiento de la carga parasitaria (Jara et al., 2013; Adams et al., 2014; Galluzzi et al., 2018).

No obstante, la implementación de PCR y/o qPCR presenta limitaciones críticas en entornos de recursos restringidos, debido a la necesidad de equipamiento especializado (termocicladores), infraestructura adecuada y personal capacitado para su operación y mantenimiento (Almassian et al., 2013; Sleator, 2016; Reithinger & Dujardin, 2007). En estos contextos, la demora en la confirmación diagnóstica de casos posterga el inicio del tratamiento antileishmanial proporcionado por el Ministerio de Salud (MINSA, 2022), incrementando el impacto clínico y socioeconómico de la enfermedad.

Ante este escenario, resulta imperativo optimizar y adaptar las técnicas moleculares para la detección de *Leishmania* spp. mediante flujos de trabajo simplificados que abarquen desde la toma, la conservación, el transporte de la muestra, preparación y obtención de resultados, en formatos cada vez más portátiles y de menor costo (Cruz et al., 2019).

Los objetivos principales para la optimización del diagnóstico molecular se centran en trasladar estas tecnologías hacia el punto de atención primaria (*Point-of-*

Care, PoC), específicamente a postas y centros de salud rurales (Reithinger & Dujardin, 2007). Este enfoque no solo busca fortalecer el diagnóstico oportuno, sino también apoyar la vigilancia epidemiológica y el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

Las técnicas de amplificación isotérmicas de ácidos nucleicos, como la *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA) y la *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP), emergen como alternativas a la PCR y la qPCR, ya que permiten la amplificación a temperatura constante, reduciendo la dependencia de instrumentación compleja. En ese sentido, estas metodologías poseen el potencial para su implementación a nivel de PoC y en escenarios rurales con limitaciones de infraestructura (Adams et al., 2010; Nzelu et al., 2019; Cossio et al., 2021). En particular, LAMP destaca por su robustez, exactitud y menores requerimientos operativos (Nzelu et al., 2016; De Faria et al., 2021; Gutiérrez et al., 2025).

En los últimos años, los sistemas CRISPR-Cas se han consolidado como herramientas innovadoras para el diagnóstico molecular, siendo considerados como diagnóstico de siguiente generación (*next-generation diagnostics*), permitiendo la detección específica de ácidos nucleicos *in vitro*. Entre las plataformas pioneras destacan SHERLOCK (basada principalmente en Cas13) y DETECTR (basada en Cas12a) (Gootenberg et al., 2017; Chen et al., 2018). Esta última integra una etapa de preamplificación de dianas específicas de ADN con el reconocimiento mediado por CRISPR, aprovechando la capacidad de corte colateral característica de las nucleasas Cas12a.

La lectura de resultados puede adaptarse a diversos formatos, como la fluorescencia mediante un lector de placas o la visualización con transiluminador de luz azul o UV, y alternativas portátiles como las tiras de flujo lateral (LFA, *lateral flow assay*). Este último en particular es especialmente prometedor para entornos PoC, ya que simplifica la obtención e interpretación del resultado, al permitir una lectura visual rápida sin instrumentación compleja. Su principio se basa en la detección de productos o reporteros oligonucleotídicos no radiactivos marcados (frecuentemente con etiquetas como biotina, fluoróforos o haptenos), cuya captura y revelado se producen por cromatografía lateral en membrana cargada con nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpos (Milenia Biotec, 2020). Este enfoque ha sido implementado de manera

eficiente en estudios previos para la detección de virus (Broughton et al., 2020; Low et al., 2023) y parásitos (Sima et al., 2022).

En la actualidad, la investigación en diagnóstico molecular de LTA se orienta a desarrollar métodos que simplifiquen el procesamiento de muestras y la integración de etapas clave como la extracción y amplificación de ácidos nucleicos y la obtención de resultados. Se ha demostrado que las técnicas moleculares mantienen su capacidad de detección en muestras obtenidas mediante procedimientos no invasivos, tales como hisopado (*swab*), discos adhesivos, cepillado histológico y papel filtro (Valencia et al., 2012; De Faria et al., 2021; Van Henten et al., 2024; Barbiero et al., 2025). Sin embargo, dado que el desempeño de estas pruebas depende estrictamente de la calidad del material genético inicial, la elección de un método de extracción eficiente de ácidos nucleicos constituye un paso crítico para lograr un diagnóstico exitoso (Taslimi et al., 2017).

En este sentido, LAMP ofrece una ventaja sustancial debido a su tolerancia reportada a inhibidores o residuos derivados del proceso de extracción, facilitando su integración en protocolos simplificados (Francois et al., 2011). Estudios previos han evaluado diversos métodos y protocolos de extracción cruda de ácidos nucleicos (p. ej., *boil-spin*), así como los basados en kits comerciales, empleados en el diagnóstico de leishmaniasis (da Silva et al., 2014; Adams et al., 2018; Chowdhury et al., 2020; Ghosh et al., 2022; De Faria et al., 2021). No obstante, persiste la necesidad de optimizar la extracción de ADN hacia formatos portátiles y orientados a reducir costos, que faciliten su implementación en escenarios con recursos limitados.

El presente estudio constituye una prueba de concepto que tiene como objetivo optimizar e implementar un ensayo LAMP–CRISPR como método de detección molecular de *Leishmania* spp., evaluando su sensibilidad y especificidad analítica, así como su desempeño en un panel de muestras clínicas recolectadas mediante métodos no invasivos (papel filtro). Para ello, se integró un sistema alternativo de extracción de ADN (dispositivo S-TECH), un flujo de trabajo basado en la producción local de enzimas recombinantes y dos modalidades de lectura de resultados (fluorescencia y tiras de flujo lateral, LFA). Con este enfoque se busca contribuir al desarrollo de estrategias diagnósticas complementarias para LTA. Finalmente, este trabajo sienta las bases para una prueba molecular simplificada con potencial de escalamiento hacia un formato de diagnóstico PoC para el diagnóstico y la vigilancia de la leishmaniasis a nivel nacional.

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales de la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA)

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios de la clase Kinetoplastea (Honigberg, 1963), del orden Trypanosomatida (Kent, 1880), de la familia Trypanosomatidae (Doeflein, 1901), género *Leishmania* spp. (Ross, 1903). Se transmite mediante la picadura de hembras infectadas de insectos vectores, flebótomos: el género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Aoun, 2014; Sharma, 2008; Ashford, 2000). Este parásito presenta un ciclo de vida digenético, prolifera en su estadio amastigote dentro del hospedero y desencadena la infección (Kaye & Scott, 2011). La gravedad de la evolución clínica varía según la especie infectante; en particular, los miembros del subgénero Viannia se asocian a un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Peres et al., 2014; Arévalo et al., 2007; Gontijo & Ribeiro, 2003).

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) tiene como principal agente etiológico a *L. (Viannia) braziliensis*. Se manifiesta inicialmente como leishmaniasis cutánea, pero puede progresar a leishmaniasis mucosa y, en casos más graves, a leishmaniasis mucocutánea (Reithinger et al., 2007; Seminario et al., 1995). Esta última representa un desafío diagnóstico particular, ya que *L. (V.) braziliensis* es reconocida por su capacidad de inducir cronicidad, latencia y metástasis, características que la distinguen de otras especies del género (Martins et al., 2014; García et al., 2005; Mendonça et al., 2004; Saravia et al., 1990).

2.2 Situación de la LTA en el Perú

Perú es uno de los diez países con mayores reportes de leishmaniasis a nivel mundial, concentrando, junto con este grupo, aproximadamente entre el 70% y el 75% de los casos estimados (Alvar et al., 2012). Entre 2015 y 2022, el sistema nacional de vigilancia reportó 31 463 casos de leishmaniasis, de los cuales el 92% correspondió a leishmaniasis cutánea (LC) y el 8% a leishmaniasis mucocutánea (LM) (MINSA, 2023; MINSA, 2023b). En el último año se registró un total de 4776 casos acumulados (MINSA 2025). Las regiones con mayor incidencia de la forma cutánea de leishmaniasis

incluyen Madre de Dios, Cajamarca, Cusco, Junín y Loreto, con una incidencia anual de 14.04/100 000 habitantes (MINSA, 2025).

Las especies de *Leishmania* de mayor prevalencia en Perú son patógenas de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, incluyendo casos donde se reportó la presencia de infecciones por híbridos de *L. braziliensis/peruviana* (Sandoval-Juárez et al., 2020; Veland et al., 2012; Nolder et al., 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Leishmania* spp. reportadas en Perú

***Leishmania* spp.**	**Región**	**Referencia**
L. (V.) braziliensis	Selva de Cuzco y Madre de Dios	De los Santos et al., 2022; Lucas et al., 1998
L. (V.) guyanensis	Madre de Dios, Ucayali y San Martín	De los Santos et al., 2022; Lucas et al., 1998
L. (V.) peruviana	Lima, Áncash, La Libertad y Cajamarca	De los Santos et al., 2022; Lucas et al., 1998
L. (L.) amazonensis	Junín, Amazonas y Ucayali	De los Santos et al., 2022; Lucas et al., 1998
L. (V.) lainsoni	Junín, Amazonas y Ucayali	De los Santos et al., 2022; Lucas et al., 1998
L. (V.) braziliensis/L. (V.) peruviana	Selva de Huánuco	Nolder et al., 2007; Sandoval-Juárez et al., 2020; Veland et al., 2012

2.3 Biomarcadores para la detección molecular de *Leishmania* spp.

El diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. se fundamenta principalmente en dos dianas genómicas multicopias del parásito, el gen 18S rDNA y el ADN del kinetoplasto (kDNA) (Al-Dhubaibi et al., 2024).

2.3.1 ADN del kinetoplasto (kDNA): ADN de minicírculos del kinetoplasto

El kDNA es una red compleja de cromatina compuesta por varios miles de círculos que se encuentran interconectados, ubicados en la matriz de su única mitocondria. Está compuesta por maxicírculos que representan unas pocas docenas de copias (<100) y minicírculos que representan miles de copias (> 10000) y que difieren según la especie de *Leishmania* (Lukeš et al., 2002).

En un estudio dirigido al reconocimiento de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* para el diagnóstico de LTA, se detectaron: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) colombiensis* y *L. (V.) guyanensis*, sin detección de aislados del subgénero *Leishmania* como: *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) chagasi*. Ello permite afirmar que se puede realizar una detección específica a nivel de subgénero con este marcador (Disch et al., 2005).

2.3.2 Gen 18S rDNA

El gen 18S codifica el ARN ribosomal 18S y es un biomarcador multicopia y altamente conservado en el género *Leishmania*, por lo que se utiliza con frecuencia en el diagnóstico molecular mediante el diseño de cebadores y sondas específicos (Bossolasco et al., 2003). Presenta entre 10 y 170 copias por genoma en *Leishmania* (Inga et al., 1998; Wilson et al., 1978).

Debido a su alta conservación, ha permitido enfoques de detección pan-*Leishmania*, siendo utilizada en diversos estudios de detección molecular (Barbiero et al., 2025; Nzelu et al., 2016; Adams et al., 2014).

Por ejemplo, en un ensayo LAMP dirigido a la diana 18S, se consiguió la detección de *Leishmania* a nivel de género (*pan-Leishmania*) en muestras clínicas mediante un *readout* inespecífico basado en la adición de malaquita verde (Nzelu et al., 2016). De la misma manera, en muestras clínicas de leishmaniasis cutánea, la

amplificación por PCR del 18S también permitió detectar *Leishmania* spp. con alta sensibilidad (Chargui et al., 2005).

En estudios comparativos se ha evaluado el desempeño de dianas multicopia para mejorar el alcance taxonómico de la detección empleando PCR acoplada a CRISPR-Cas12a. Dueñas et al. (2022) analizaron ambas dianas, 18S rDNA y kDNA, logrando detección pan-*Leishmania* mediante 18S y detección a nivel del subgénero *Viannia* al dirigir el ensayo al kDNA. Los ensayos alcanzaron límites de detección de 0.05 equivalentes genómicos de parásitos (e.g.p.) por reacción para kDNA y 5 e.g.p./reacción para el marcador 18S, demostrando que, si bien el kDNA es más sensible, el 18S ofrece una cobertura taxonómica complementaria (Dueñas et al., 2022).

2.4 Métodos alternativos para la extracción de ADN en muestras clínicas de leishmaniasis

El uso de kits comerciales para realizar la extracción de ácidos nucleicos permite obtener valores de alta integridad y pureza. Sin embargo, esto puede significar un precio relativamente elevado y aumentar los costos globales de las pruebas diagnósticas en países de bajos recursos o en vías de desarrollo (*middle-income countries* (MIC)) (Dueñas et al., 2026; Gutiérrez-Guarnizo et al., 2025).

Por lo tanto, la preparación de las muestras constituye uno de los principales desafíos para la implementación de ensayos moleculares en dichos entornos (Dineva et al., 2007). Se requieren investigaciones adicionales para optimizar protocolos rápidos de extracción de ADN, como *boil-spin* (Ghosh et al., 2022) y *SpeedXtract* (un método basado en perlas magnéticas) (Gunaratna et al., 2018). Actualmente, se busca la simplificación y la portabilidad en las nuevas alternativas de extracción de ADN que permitirán optimizar un flujo de trabajo de diagnóstico molecular cercano al punto de atención (*near*-PoC) para la leishmaniasis cutánea y otras formas de leishmaniasis.

2.5 Diagnóstico molecular de LTA

En el diagnóstico convencional de la leishmaniasis se emplean pruebas parasitológicas, como la microscopía y los métodos de aislamiento en cultivo. Sin embargo, estas aproximaciones presentan limitaciones críticas, entre ellas una sensibilidad variable supeditada a la pericia del operador. Se ha observado que la

sensibilidad de la microscopía disminuye drásticamente en lesiones de mayor duración, con valores reportados entre el 25% y el 50% (Boggild et al., 2010; Saravia et al., 1990; Weigle, 2002); lo cual se atribuye a las bajas cargas parasitarias que poseen las lesiones cutáneas crónicas y las lesiones de mucosas (Gomes et al., 2014; Jara et al., 2013; Weigle, 2002). En consecuencia, la incorporación de técnicas moleculares resulta fundamental para complementar y fortalecer el diagnóstico parasitológico de rutina (Akhoundi et al., 2017; Reithinger & Dujardin, 2007).

Diversos estudios reportan que la PCR es una herramienta sensible y específica ampliamente utilizada para la detección de *L. (Viannia)* en muestras clínicas. En el diagnóstico de LC, se han registrado variaciones en la frecuencia de detección según el tipo de muestra: 83.9% en lisados de biopsia frente a 74.7% en aspirados (Weigle, 2002). Asimismo, el uso de papel filtro para la recolección de muestras clínicas ha demostrado un buen desempeño diagnóstico, con sensibilidad del 97.8% y especificidad del 100% (Bensoussan et al., 2006). Para el diagnóstico de LC y LM, la PCR ha demostrado niveles óptimos de precisión, especificidad y sensibilidad, mediante métodos de obtención de muestras mínimamente invasivos tales como el hisopado nasal, la toma de saliva e impresiones de la cavidad oral en papel filtro (Gomes et al., 2014).

En Perú, en un estudio orientado al diagnóstico de LC y la identificación del subgénero *L. (Viannia)* usando como diana el marcador kDNA, se evidenció que la PCR alcanzó una sensibilidad del 96.9% y una especificidad del 65.9%, en comparación con métodos convencionales como el cultivo, microcultivo de parásitos, examen directo (microscopía a partir del frotis de la lesión) y la prueba cutánea de leishmaniasis (LST), donde la sensibilidad y especificidad promedio para dichas pruebas fueron entre 72% y 90%, respectivamente (Boggild et al., 2010).

Por otro lado, la PCR cuantitativa (qPCR) se ha consolidado como una técnica altamente sensible y eficiente para la detección de *Leishmania* spp., permitiendo la cuantificación de niveles bajos de carga parasitaria (Jara et al., 2013). De igual forma, se han reportado valores elevados de desempeño diagnóstico con qPCR dirigida al marcador kDNA en el diagnóstico de LTA y leishmaniasis visceral (LV), con valores de sensibilidad de 97.9-100% y especificidad de 87.5-100% (Galluzzi et al., 2018; Jara et al., 2013). Asimismo, en un estudio de optimización de qPCR dirigida a la diana 18S

rDNA para el diagnóstico de LTA se reportó una especificidad de 100% y una sensibilidad de 98.5% (Braga et al., 2020).

2.6 Técnica de amplificación *"Loop-mediated isothermal amplification"* (LAMP)

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*) (Figura 1), desarrollada por Notomi et al. (2000), constituye una alternativa robusta a la PCR convencional debido a su capacidad para generar grandes cantidades de producto a partir de la región diana del ácido nucleico en periodos cortos de tiempo. LAMP se caracteriza por operar a temperatura constante (55–65 °C) produciendo resultados en intervalos de 20 a 40 minutos. Estas ventajas reducen significativamente la dependencia de termocicladores e infraestructura de alta complejidad (Mori & Notomi, 2009; Tomita et al., 2008). Gracias a su reducido requerimiento instrumental y su potencial bajo costo, la técnica LAMP es especialmente idónea para su implementación en entornos con recursos limitados (Cossio et al., 2021; Nzelu et al., 2019; Adams et al., 2010).

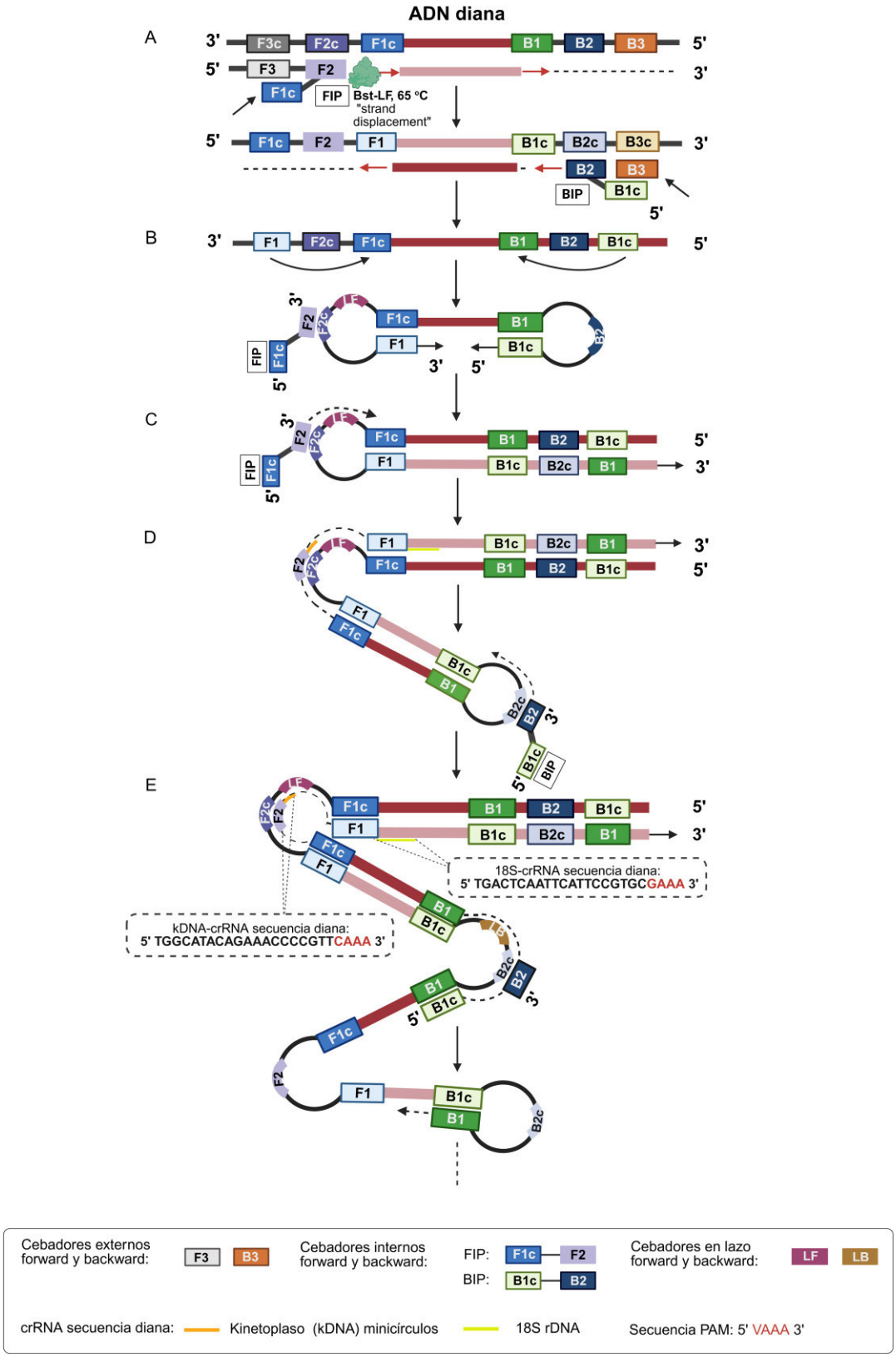


Figura 1. Reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Esta figura se elaboró de *novo* basada en el mecanismo descrito por Notomi et al. (2000) y Parida et al. (2008). Imagen obtenida de Dueñas et al. (2026).

Estudios previos indican que la técnica de amplificación por LAMP alcanza un límite de detección de 10^3 equivalentes genómicos de parásitos/ml para la detección de *L. siamensis* (Sriworarat et al., 2015). Asimismo, se han reportado niveles de sensibilidad superiores, entre 10 y 10^2 equivalentes genómicos de parásitos/ml, para especies como *L. donovani, L. guyanensis, L. major, L. tropica, L. mexicana, L. braziliensis, L. amazonensis, L. aethiopica*, y *L. infantum* (Adams et al., 2010). Diversas investigaciones que emplean marcadores moleculares multicopia han descrito valores de sensibilidad diagnóstica promedio entre 80% y 100%, con una especificidad situada entre 94% y 100% (Nzelu et al., 2019). No obstante, la técnica presenta limitaciones críticas, tales como la formación de productos de amplificación inespecíficos (Wang et al., 2015) y una alta susceptibilidad a la contaminación por amplicones previos, lo cual puede comprometer la fiabilidad del diagnóstico al generar resultados falsos positivos (Nzelu et al., 2019).

2.7 Enzima polimerasa para la reacción LAMP: Bst de *Geobacillus stearothermophilus*

La ADN polimerasa I de *Geobacillus stearothermophilus* (antes *Bacillus stearothermophilus*), conocida como Bst *DNA polymerase*, fue descrita inicialmente mediante estudios de purificación y caracterización en la década de 1970 (Stenesh & Roe, 1972). Esta enzima se distingue por su actividad polimerasa 5′→3′ y una notable capacidad de desplazamiento de hebra (*strand displacement*), propiedad que le permite sintetizar ADN mientras separa localmente la doble hebra. Su actividad catalítica óptima se sitúa alrededor de 60°C a 65°C (Ye & Hong, 1987), lo que la hace idónea para métodos de amplificación isotérmica.

La variante Bst *DNA polymerase, large fragment* (Bst-LF) fue reportada por Ye & Hong (1987) tras obtener, mediante digestión proteolítica con subtilisina, un fragmento termoestable. Esta variante conserva la actividad polimerasa 5′→3′, pero carece del dominio N-terminal con actividad exonucleasa 5′→3′. La pérdida del dominio N-terminal confiere a la Bst-LF una masa molecular de aproximadamente 67 kDa (Aliotta et al., 1999). Investigaciones previas sugieren que, en polimerasas de gran tamaño, el dominio N-terminal es esencial para el plegamiento correcto de la proteína; su ausencia puede derivar en un plegamiento lento o ineficiente, comprometiendo potencialmente la estabilidad estructural (Li et al., 2023; Maranhao et al., 2020; Naganathan y Muñoz, 2004; Krishna y Englander, 2005).

Adicionalmente, se han realizado procesos de optimización mediante la aplicación de la ingeniería de proteínas (p. ej., mutagénesis dirigida, evolución dirigida y diseños asistidos por computación (*machine learning*)) para mejorar el desempeño de esta enzima (Damry & Jackson, 2021; Sinha & Sukla, 2019). El desarrollo de variantes de Bst-LF con mayor actividad catalítica y más termoestables (Li et al., 2023; Paik et al., 2022) ha impulsado su utilización en plataformas diagnósticas isotérmicas y fomentar su producción enzimática local (*in house*).

2.8 Tecnología CRISPR-Cas12a

La implementación de los sistemas CRISPR–Cas en el diagnóstico molecular se ha consolidado como una herramienta innovadora para la detección específica de ácidos nucleicos *in vitro* gracias a enfoques pioneros como SHERLOCK y DETECTR (Gootenberg et al., 2017; Chen et al., 2018).

En la plataforma DETECTR, la nucleasa Cas12a es guiada por un crRNA (ARN guía) que reconoce la secuencia diana de ADN y forma un complejo ribonucleoproteico (RNP). Este reconocimiento desencadena la escisión en *cis* del ADN diana y, posteriormente, un cambio conformacional que activa la actividad colateral de Cas12a. Esta actividad es responsable de la escisión en *trans* (‘*trans-cleavage*’) de moléculas de ADN de hebra simple (ssDNA) de manera no específica (Chen et al., 2018). Alternativamente, este principio puede adaptarse a un formato de ensayo de flujo lateral (LFA) utilizando reporteros marcados (p. ej., sondas de ssDNA marcadas con biotina y un fluoróforo) que permiten una lectura visual rápida por cromatografía lateral (Chen et al., 2018; Broughton et al., 2020).

Estos formatos han sido aplicados con éxito en salud pública; por ejemplo, en la detección de SARS-CoV-2, donde se reportó alta concordancia entre lecturas por fluorescencia y LFA (Broughton et al., 2020), así como en la detección de *Trypanosoma* spp. (subgénero *Trypanozoon*) (Sima et al., 2022) y de *T. cruzi* utilizando el gen *Hsp70* (Gutiérrez-Guarnizo et al., 2025). Asimismo, se han descrito aplicaciones para *Mycobacterium tuberculosis* (Ai et al., 2019), arbovirus como Zika y dengue (Gootenberg et al., 2017, 2018; Myhrvold et al., 2018), y protozoarios como *Plasmodium* spp. (Lee et al., 2020; Cunningham et al., 2021). En el caso de *Leishmania* spp., investigaciones recientes han reportado el acoplamiento de la técnica de PCR con el sistema CRISPR–Cas12a para su detección molecular (Dueñas et al., 2022).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Implementar una técnica basada en LAMP-CRISPR para la detección molecular de *Leishmania* spp. en muestras clínicas.

3.2 Objetivos específicos:

- Estandarizar y evaluar el uso de una enzima ADN polimerasa Bst-LF (de *Geobacillus stearothermophilus*) recombinante producida *in house* para la pre-amplificación por LAMP de la secuencia diana de kDNA y 18S rDNA.

- Determinar la sensibilidad y especificidad analítica de los ensayos LAMP-CRISPR para la detección de *Leishmania* spp.

- Adaptar la lectura de los ensayos LAMP-CRISPR a un formato portátil empleando tiras de flujo lateral (LFA).

- Evaluar el desempeño de los ensayos LAMP-CRISPR para detectar *Leishmania* spp. en muestras clínicas procesadas con el dispositivo portátil S-TECH, comparando la lectura por fluorescencia y LFA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Las muestras de ADN que se evaluaron en el presente trabajo derivan de muestras tomadas en papel filtro a partir de lesiones cutáneas y de mucosa humanas que cuentan con la confirmación del estatus de infección por *Leishmania* (resultado positivo o negativo) determinado por análisis previos de PCR y qPCR dirigidos a la diana kDNA.

Los pacientes brindaron su consentimiento informado para el uso de sus muestras en la investigación. Estas muestras fueron proporcionadas por la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde, docente del Departamento Académico de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC). Las muestras fueron tomadas en el marco del proyecto de investigación titulado "LFA con péptidos y fragmentos antigénicos de proteínas conservadas para el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria en Cusco, Perú" (Contrato No. PE501083417-2023-PROCIENCIA), a cargo de la Dra. Quispe. El proyecto fue presentado y aprobado por el Comité de Bioética Institucional en Investigación de la UNSAAC (carta N° CBI-UNSAAC2024-002 de fecha 24-05-2024).

4.2 Material biológico

Se evaluó el ADN genómico (ADNg) de 17 muestras clínicas recolectadas en la región Cusco, Perú, correspondientes a lesiones cutáneas (n = 8), lesiones mucosas (n = 5) y controles endémicos (n = 4). Las muestras fueron obtenidas por la Dra. María Cruz Saldarriaga en el Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco y procedían de distintas zonas endémicas de leishmaniasis, incluidas Cusco (provincias de La Convención y Ocobamba) y Madre de Dios (Inambari, Tambopata y Manu) (Figura 2A). La toma de muestra se realizó mediante un método no invasivo, utilizando papel filtro sobre lesiones localizadas en diversas áreas anatómicas, como axila, extremidades inferiores, pies, frente, párpado, úvula y fosas nasales (Figura 2B). El tiempo de evolución de las lesiones osciló entre 1 y 12 meses. Diez pacientes presentaron antecedentes de leishmaniasis. Los pacientes fueron evaluados en la ciudad del Cusco mediante revisión clínica y las muestras se analizaron mediante PCR

convencional dirigida al marcador kDNA, a partir de ADN extraído con el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

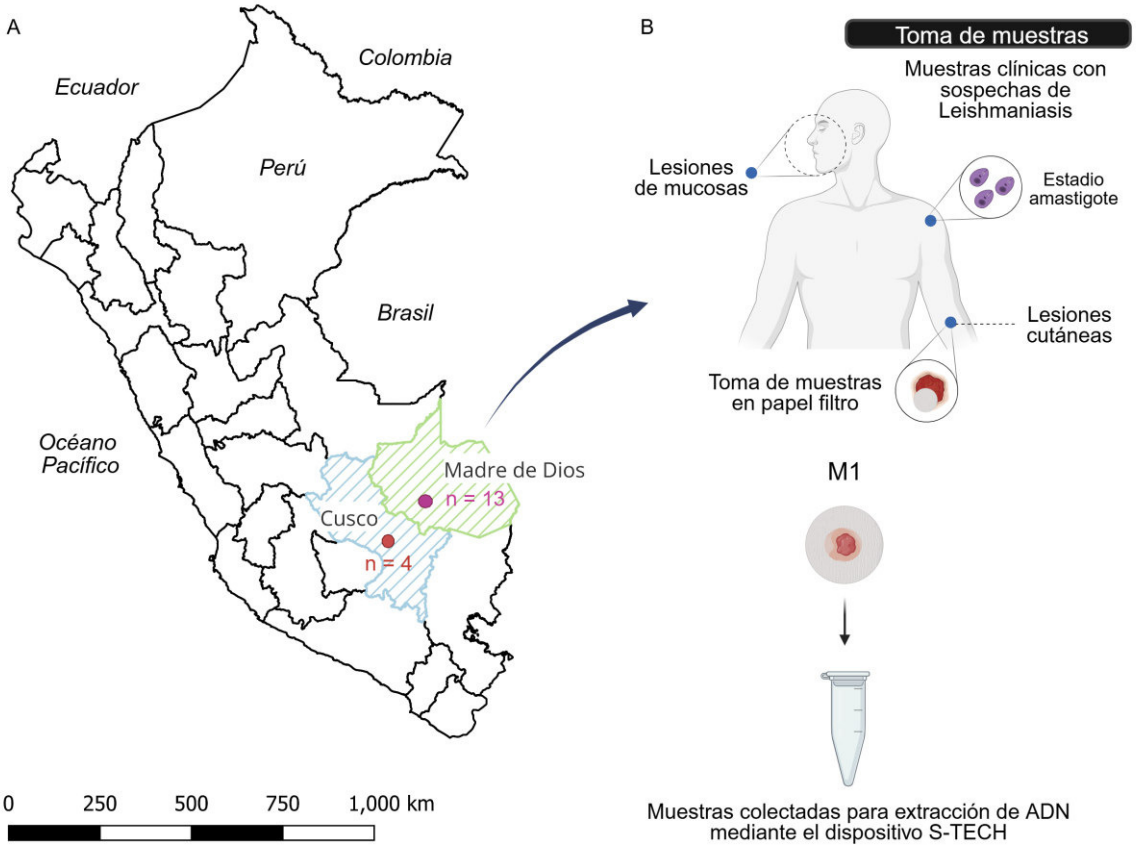


Figura 2. Obtención de muestras de lesiones cutáneas y mucosas de pacientes con casos presuntivos de leishmaniasis. (A) Mapa del Perú que señala las regiones de procedencia de las muestras clínicas analizadas. (B) Toma de muestras clínicas para el proceso de extracción y posterior purificación de ADN mediante el dispositivo S-TECH (https://www.dnaitech.com/s-tech).

En el presente trabajo, la detección molecular de *Leishmania* spp. y cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR dirigida al marcador kDNA, así como la evaluación del desempeño del ensayo LAMP–CRISPR en las muestras clínicas, se realizaron bajo un diseño de estudio ciego en el Laboratorio de Biomoléculas del Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).

Para la validación analítica de los ensayos LAMP-CRISPR se analizaron muestras de ADNg extraído de promastigotes en cultivo de cepas de referencia representativas de distintas especies de *Leishmania* patógenas para el ser humano. Estas incluyeron los subgéneros: (1) *L. (Viannia)* [*L. (V). braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L. (V). peruviana* (MHOM/PE/90/LCA08), *L. (V). guyanensis* (IPRN/PE/87/Lp52), *L. (V). lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426)] y (2) *L. (Leishmania)* [*L. (L.) amazonensis* LV79 (MPRO/BR/72/M1841), *L. (L.) major* (MHOM/SU/73/5-ASKH), *L. (L.) infantum* (MHOM/TN/80/IPT1), *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/80/DD8 LEM 703)].

Adicionalmente, se evaluó la especificidad frente a otros microorganismos patógenos: *Trypanosoma cruzi* (cepas Sylvio X10, VT-1, Tulahuen LacZ clone C4), *Mycobacterium tuberculosis* (cepa PA155-18C) y *Plasmodium falciparum* (cepa HB3). Las muestras de ADNg obtenidas de donantes sanos fueron extraídas a partir de células de sangre periférica humana (PBMCs). Este material biológico fue proporcionado por los investigadores colaboradores: el Dr. Jorge Arévalo (Laboratorio de Patho-antígenos, Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, LID-UPCH), las doctoras Edith Málaga y Manuela Verástegui (UPCH) y el Dr. Carlos Restrepo (Centro de Biología Molecular y Celular de Enfermedades, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología - INDICASAT AIP, Panamá). Los detalles de las cepas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas en este trabajo

Nombre de las cepas	Código OMS[¥]	Fuente[§]
Leishmania (Viannia) braziliensis	MHOM/BR/75/M2904	IMTAvH-UPCH
Leishmania (Viannia) peruviana	MHOM/PE/90/LCA08	IMTAvH-UPCH
Leishmania (Viannia) guyanensis	MHOM/BR/1975/M4147	IMTAvH-UPCH
Leishmania (Viannia) lainsoni	MHOM/BR/1981/M6426	INDICASAT-AIP
Leishmania (Viannia) panamensis	MHOM/PA/2018/BD-02	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) amazonensis	MHOM/BR/1973/M2269	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) mexicana	MHOM/BZ/1982/BEL21	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) aristidesi	MORY/PA/1969/GML	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) major	MHOM/SA/1991/WR-1088	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) infantum	MCAN/BR/1997/P142	INDICASAT-AIP
Leishmania (Leishmania) donovani	MHOM/IN/2006/WR-2801	INDICASAT-AIP
Trypanosoma cruzi	Sylvio X10	UPCH
Trypanosoma cruzi	VT-1	UPCH
Trypanosoma cruzi	Tulahuen LacZ clone C4	UPCH
Plasmodium falciparum	HB3	INDICASAT-AIP
Mycobacterium tuberculosis	PA155-18C	INDICASAT-AIP

¥El código de designación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se presenta de la siguiente manera: hospedero (M para Mammalia; HOM = *Homo sapiens*; CAN = *Canis familiaris*; ORY = *Oryzomys capito*)/país de origen (BR = Brasil; BZ = Belice; IN = India; PA = Panamá; PE = Perú; SA = Arabia Saudita)/año de aislamiento/nombre de la cepa.
§La procedencia de las cepas cuyo ADN genómico fue analizado en este estudio es la siguiente: IMTAvH, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt; UPCH, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), en Lima, Perú. INDICASAT-AIP, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá.

Para la expresión *in house* de la proteína recombinante ADN polimerasa Bst-LF, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BLR(DE3) obtenida comercialmente (Thermo Fisher Scientific). Esta cepa fue proporcionada en el marco de una colaboración con el Dr. Daniel Guerra Giraldez, líder del Laboratorio de Moléculas Individuales de la UPCH.

4.3 Producción local (*in house*) de la proteína recombinante ADN polimerasa Bst-LF

4.3.1 Generación de cepas transformantes de *E. coli* BLR(DE3)

Para la expresión de la ADN polimerasa Bst-LF, se utilizó el plásmido pTI-Bst-LF, el cual posee un *cassette* de resistencia a kanamicina y un promotor T7 inducible por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido). Como sistema de expresión, se empleó la cepa hospedera *E. coli* BLR(DE3).

La preparación de células competentes se realizó utilizando el kit *Mix & Go Competent Cells* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transformación se realizó mediante choque térmico: se tomaron 100 µL de células competentes de la cepa BLR(DE3), se añadieron 118 ng de plásmido y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 400 µL de medio SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite* represión y 0.4% de glucosa) y se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación a 250 rpm (Mendoza-Rojas et al., 2021).

Finalmente, las colonias obtenidas se sembraron en placas con agar LB (*Luria–Bertani*) suplementado con kanamicina (0.05 mg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h. Tras este periodo, se realizó el recuento de colonias recombinantes y se seleccionaron cuatro colonias al azar para su verificación mediante PCR (*PCR colony*) dirigida a la región del promotor T7 del plásmido.

4.3.2 Expresión y purificación de la proteína ADN polimerasa Bst-LF

Siguiendo el protocolo de Rivera et al. (2020), se inoculó una colonia seleccionada en 20 mL de medio LB líquido suplementado con kanamicina (0.05 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 16 h a 200 rpm de agitación. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 600 nm (OD600). Para iniciar un cultivo en fase exponencial, se preparó un volumen de 500 mL de medio fresco en un matraz de 2 L, ajustando el inóculo para obtener una OD600 inicial de 0.05. El cultivo se mantuvo en incubación bajo las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar una OD_{600} de 0.6–0.8 (aprox. 3 horas). La expresión proteica se indujo mediante la adición de IPTG (0.5 mM) y se continuó con la incubación a 18 °C durante 16 h (*overnight*) con agitación constante a 200 rpm (Figura 3).

Finalizado el periodo de inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 4000 × g, durante 30 min a 4 °C. El *pellet* se resuspendió en 40 mL de tampón de unión (adaptado según el protocolo de Paik et al. (2023), *binding buffer*: 50 mM de tampón fosfato, 20 mM de imidazol, 300 mM de NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM de $MgSO_4$, pH 7.7) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y

el sedimento se resuspendió en un volumen de tampón proporcional a su peso, suplementado con PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) (1 mM) como inhibidor de serinoproteasas y lisozima (0.2 mg/mL).

La lisis celular se realizó mediante sonicación en frío (durante 15 min, con intervalos de 2 s ON / 3 s OFF). Para desnaturalizar las proteínas termolábiles propias del sistema de expresión *E. coli* BLR(DE3), el lisado se sometió a un tratamiento térmico a 65 °C durante 25 min en baño maría, seguido de 5 min en hielo (Rivera et al., 2020). La fracción insoluble se eliminó por centrifugación a 2000 × g (30 min a 4 °C). El sobrenadante resultante se recuperó y se filtró utilizando una membrana de 0.22 µm. (Figura 3).

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) con níquel (Ni^{2+}), utilizando columnas de 1 mL acopladas a un sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) (Figura 3). La columna se equilibró con 20 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibración (50 mM de tampón fosfato, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol y Triton X-100 al 10%, pH 7.7). Tras la carga de la muestra, se realizó un lavado con 5 CV de un tampón de lavado (50 mM de tampón fosfato, 300 mM de NaCl, 50 mM de imidazol y Triton X-100 al 10%, pH 7.7). Ambos tampones fueron adaptados del protocolo del kit *His-Spin Protein Miniprep*™ kit de (Zymo Research).

La elución de las fracciones se llevó a cabo utilizando un tampón optimizado (50 mM de tampón fosfato, 300 mM de NaCl y 250 mM de imidazol, pH 7.7), basado en el protocolo de kit *His-Spin Protein Miniprep*™ (Zymo Research). Posteriormente, el perfil proteico de las fracciones se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12.5% y tinción con azul de Coomassie, lo que permitió identificar la presencia de la proteína recombinante Bst-LF (Figura 3).

Las fracciones positivas se sometieron a un intercambio de solución tampón mediante diálisis durante 16 h a 4 °C, procurando la conservación de la proteína con el tampón de almacenamiento (adaptado del protocolo de Paik et al. (2023), *storage buffer*:

50% de glicerol, 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0.1% v/v de Tween-20, 0.1% de NP-40 y 1 mM DTT). Finalmente, la proteína purificada se fraccionó en alícuotas de 25 µL y se almacenó a −80 °C. La cuantificación de la concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford.

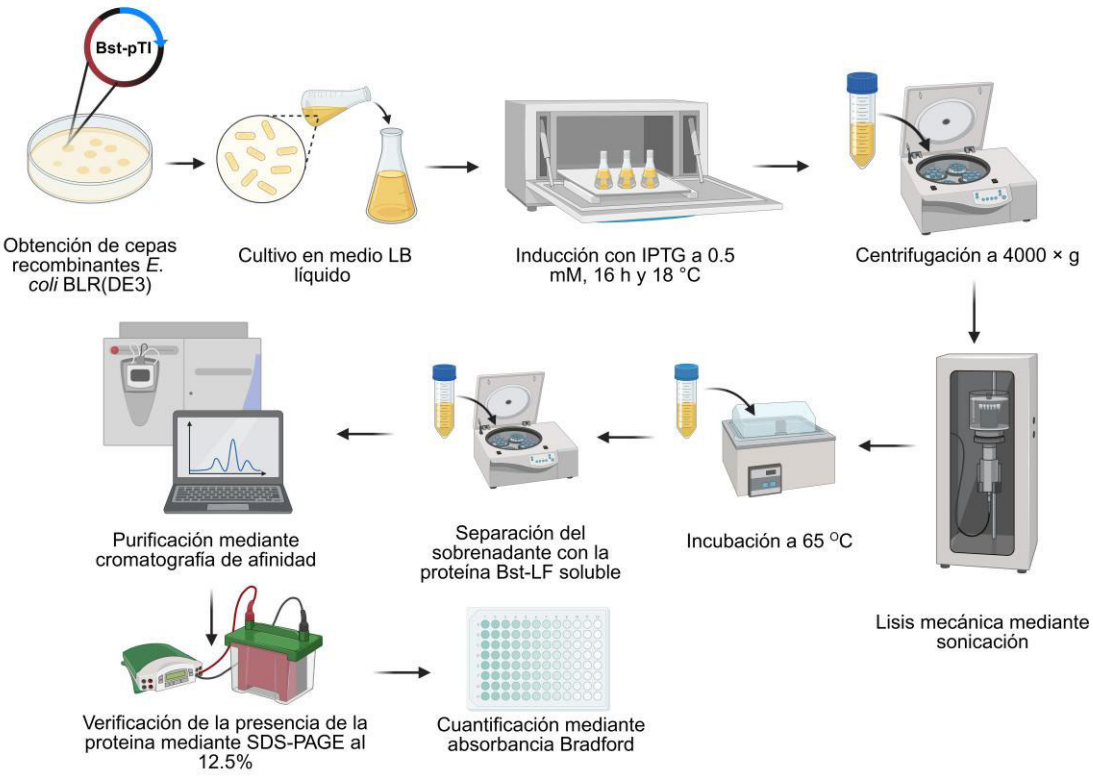


Figura 3. Representación esquemática del proceso de expresión y purificación local (*in house*) de la enzima recombinante Bst-LF ADN polimerasa.

4.4 Análisis *in silico* de la especificidad de cebadores de LAMP y del crRNA

Los cebadores de LAMP empleados en este estudio fueron diseñados por ex miembros del Laboratorio de Biomoléculas – UPC (Luis Cabrera Sosa y José Alberto Nakamoto) y sus secuencias están descritas en un estudio reciente (Dueñas et al., 2026). Estos cebadores se diseñaron para flanquear la región del ADN diana que es reconocida por el crRNA. Para este último se utilizaron secuencias guía de crRNA para LbCas12a dirigidas a minicírculos de kDNA (Figura 3) y al gen 18S rDNA (Figura 4), según lo reportado por Dueñas et al. (2022).

Para evaluar la especificidad de los cebadores LAMP *in silico*, se descargaron todas las secuencias de ADN disponibles en NCBI para cada diana hasta mayo del 2025.

- Para el análisis de secuencias de minicírculos de kDNA de *Leishmania*, se retuvieron y analizaron, tras un proceso de filtrado por calidad, 1060 secuencias del subgénero *L. (Viannia)* y 965 secuencias del subgénero *L. (Leishmania)*. Se excluyeron las secuencias que contenían pares de bases ambiguos (p. ej., "N") ya que excedían el 10% de la longitud total o no cubrían los sitios de unión de los cebadores. Las ocho regiones de unión de cebadores LAMP y el sitio diana del crRNA se anotaron manualmente usando Jalview v2.11.4.1 (Waterhouse et al., 2009) tras el alineamiento múltiple de secuencias con Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Un subconjunto representativo de 59 secuencias (24 *Viannia*, 35 *Leishmania*) se detalla en la Figura S1 (Anexo 1) para ilustrar la conservación o variación de secuencia entre ambos subgéneros.

- Para el 18S rDNA, se alinearon y analizaron 37 secuencias de *Leishmania* spp. y 272 de *Trypanosoma* spp. bajo el mismo flujo de análisis bioinformático. Se seleccionó un subconjunto de 31 secuencias representativas (16 *Leishmania* spp., 15 *Trypanosoma* spp.) para evidenciar la conservación o variaciones de secuencia entre los dos géneros de tripanosomátidos analizados (Figura S2 del Anexo I).

4.5 Obtención del crARN (CRISPR ARN) dirigido al kDNA y al gen 18S rDNA

La síntesis de los crRNA se realizó mediante transcripción *in vitro* siguiendo el protocolo de Dueñas et al. (2022), utilizando el kit *TranscriptAid T7 High Yield*. Como moldes de ADN de doble hebra (dsADN) sintéticos (Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur), los cuales contienen el promotor del fago T7, la secuencia de andamiaje (*scaffold*) del crARN para LbCas12a (Chen et al., 2018) y la secuencia guía (o espaciadora) de 20 nucleótidos (Beckert & Masquida, 2010), complementaria a la secuencia diana de ADN (como se detalla en Alcántara et al. (2021)) (Figuras 4 y 5).

Cada reacción de transcripción tuvo 39 µL de volumen final y consistió en 8 µL de buffer 5X, 16 µL de la mezcla de nucleótidos trifosfato (NTPs), 4 µL de la enzima T7 ARN polimerasa del kit y 11 µL de agua de grado molecular; a la reacción se agregaron 100 pmoles del molde de dsADN y se incubó a 37 °C por 3 h. Posteriormente, el crARN se purificó con el kit *Direct-zol RNA miniprep* (ZymoResearch) según las recomendaciones del proveedor. Los crARNs obtenidos se cuantificaron (~ 70 µM) mediante el instrumento Nanodrop OneC, con valores adecuados de índices de pureza A260/A280 y A260/A230 (medidas de absorbancia) entre 1.8 a 2.2. Los crARNs se almacenaron a −80°C.

4.6 Estandarización y análisis de amplificación del ADN diana con la técnica LAMP

La estandarización del ensayo LAMP se inició empleando la ADN polimerasa comercial Bst 2.0 (New England Biolabs, NEB, Massachusetts, EE. UU.; Cat. M0537). Se utilizó el tampón de amplificación isotérmico (*isothermal amplification buffer*, IAB) de NEB 1X (20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM de $MgSO_4$ y Tween-20 al 0.1%; pH 8,8). Para optimizar los tiempos de incubación de cada marcador (kDNA y 18S rDNA), se evaluaron tres concentraciones de ADNg de la cepa de referencia *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, correspondientes a 2×10^2, 2×10^1 y 2×10^{-3} equivalentes genómicos de parásitos (e.g.p.) por reacción.

Una vez establecidos los parámetros iniciales, se determinó la concentración mínima óptima de la ADN polimerasa Bst-LF recombinante. Mediante diluciones seriadas (inicialmente a razón de 10 y posteriormente a razón de 2) evaluadas en duplicado. Para este ensayo se emplearon 5×10^2 e.g.p./reacción del marcador kDNA y un control negativo para LAMP (NTC-LAMP, *no template control*). Las condiciones de la reacción LAMP se basaron en protocolos previamente descritos (Fernández-Soto et al., 2014; Yupanqui, 2022). El volumen final fue de 25 µL, compuesto por IAB 1X, $MgSO_4$, dNTPs (1.3 mM), mezcla de cebadores LAMP (1X) y ADN molde (8.33 ng/µL). De manera análoga, se optimizó la concentración de $MgSO_4$ para cada marcador: kDNA (5.8; 6.3; 6.8; 7.3; 7.8 mM) y 18S rDNA (5.8; 7.8; 9.8; 11.8 mM).

La localización de los cebadores LAMP para los marcadores kDNA (Figura 4) y 18S rDNA (Figura 5) se definió dentro de las regiones diana seleccionadas. La mezcla de cebadores 10X consistió en FIP (16 µM), BIP (16 µM), F3 (2 µM), B3 (2 µM), LF (8 µM) y LB (8 µM). Estas concentraciones fueron estandarizadas por el Laboratorio de Biomoléculas de la UPC.

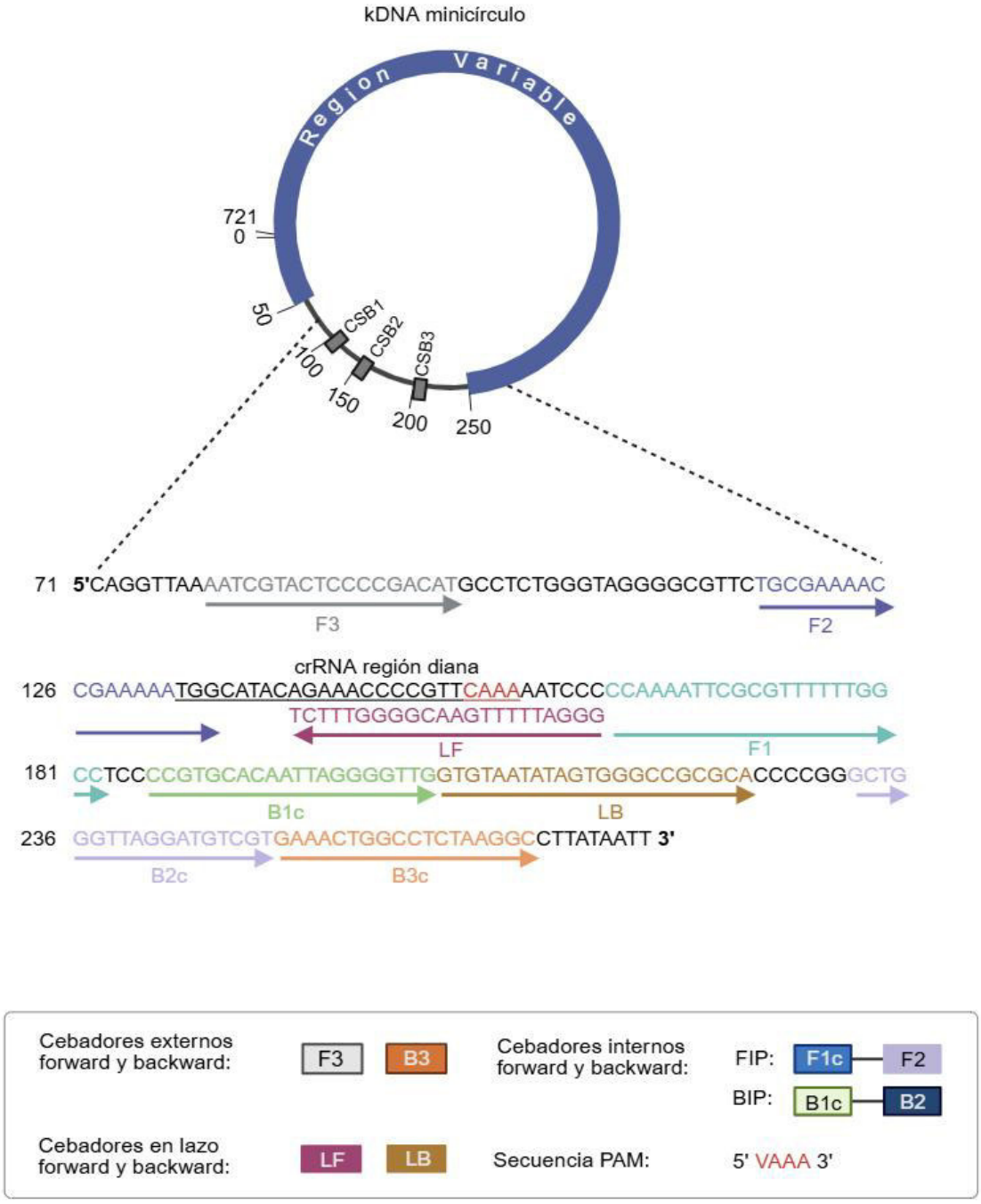


Figura 4. Ubicación de los cebadores LAMP y del sitio diana del crRNA en la región genómica del marcador kDNA. Se muestra la secuencia del minicírculo kDNA de la cepa *L. braziliensis* M2904 (GenBank KY698803.1). Las flechas hacia la derecha e izquierda indican la orientación de las secuencias (*downstream* o *upstream*). La secuencia PAM en el ADN diana se encuentra resaltada (en rojo).

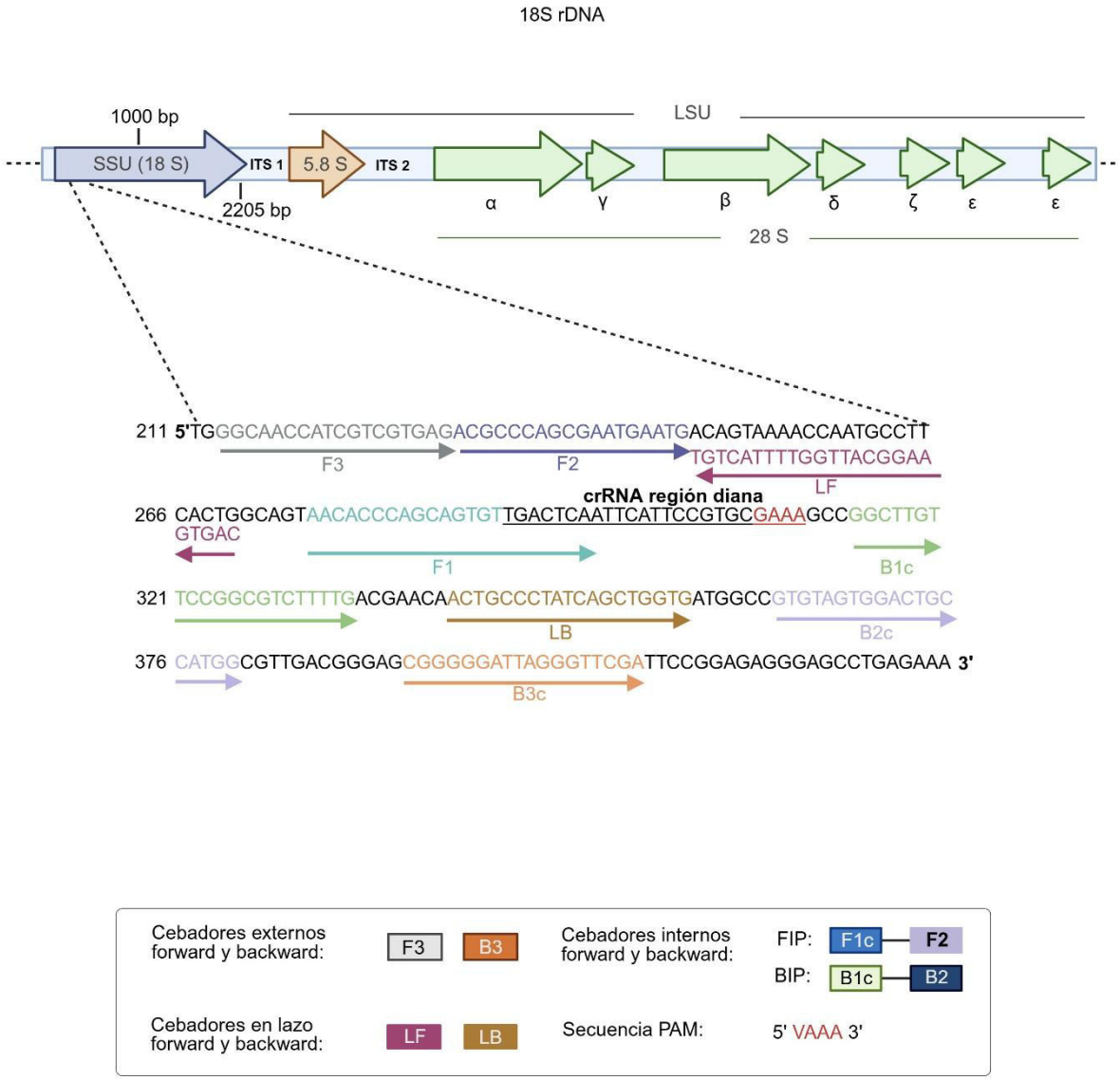


Figura 5. Ubicación de las secuencias de los cebadores de LAMP y del sitio diana del crRNA en la región genómica del marcador 18S rDNA. Se muestra una región del gen 18S rDNA correspondiente a la cepa *L. braziliensis* M2904 (TriTrypDB ID: LbrM.27.2.208540). Las flechas hacia la derecha e izquierda indican la orientación de las secuencias (downstream o *upstream*). La secuencia PAM en el ADN diana está resaltada (en rojo).

4.7 Optimización y validación analítica de los ensayos LAMP-CRISPR mediante lecturas de fluorescencia

Tras la estandarización de LAMP, se procedió al acoplamiento con el sistema CRISPR–Cas12a, adaptando el protocolo descrito por Broughton et al. (2020). Para la reacción CRISPR se empleó la nucleasa recombinante LbCas12a, producida y purificada *in house* en el Laboratorio de Biomoléculas de la UPC (Mendoza-Rojas et al., 2021). El ensayo se desarrolló en un tampón para Cas12a (1X), basado en la receta estándar comercial del NEBuffer 2.1, suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) a 100 µg/mL.

El crRNA fue diluido en una proporción 1:10 y sometido a un pretratamiento térmico a 65 °C durante 10 min para promover su correcto replegamiento (*refolding*).

Con el fin de optimizar el tiempo de respuesta y la sensibilidad de la señal, se evaluaron tres sondas reporteras fluorescentes: 6-FAM/TTATT/3′ IABkFQ (Ding et al., 2020; "sonda corta"), 6-FAM/TTATTCCCCCC/3′ IABkFQ (Lee et al., 2022; "sonda larga") y 6-FAM-CTCTCATTTTTTTTTAGAGAG-(BHQ1) (Rossetti et al., 2022; "sonda hairpin"). Todas las sondas fueron adquiridas mediante Macrogen, Seúl, Corea del Sur.

La formación del complejo ribonucleico (RNP) CRISPR se realizó mediante la preparación de una mezcla 10X (volumen total de 10 µL) compuesta por tampón Cas12a (1X), crRNA (0.15 µM), LbCas12a (0.1 µM) y la sonda reportera *hairpin* (2 µM). Este complejo fue incubado por 10 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad para asegurar su estabilidad antes de la detección.

Para la fase de detección, se tomaron 2 µL del producto de amplificación por LAMP y se mezclaron con tampón Cas12a (1X) y el cofactor $MgCl_2$, hasta alcanzar un volumen intermedio de 106 µL. Posteriormente, se dispensaron 90 µL de este amplicón diluido en una microplaca de 96 pocillos negra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States; Cat. no. 237107) y se añadieron 10 µL del complejo CRISPR 10X, completando un volumen final de 100 µL por reacción. La concentración final de $MgCl_2$ en la reacción fue de 15 mM.

El proceso de estandarización incluyó rigurosos controles de calidad, tales como un control positivo (consistente en 5 x 10^2 e.g.p./reacción de *L.(V) braziliensis*), un

control negativo para LAMP (NTC-LAMP) sin ADNg y un control negativo específico de la reacción CRISPR (NTC-CRISPR, sin producto de amplificación LAMP). Las lecturas de fluorescencia se registraron en intervalos de 1 min durante un periodo de 60 min, utilizando el lector Varioskan LUX (Thermo). Las condiciones de incubación se mantuvieron constantes para permitir la cinética enzimática de la nucleasa Cas12a.

4.8 Optimización analítica del ensayo LAMP-CRISPR mediante lecturas LFA

Se realizaron ensayos de optimización del sistema LAMP–CRISPR adaptado a una plataforma de detección mediante tiras de flujo lateral (LFA). El proceso de optimización se centró en la evaluación crítica de las distintas concentraciones (5000, 2500 y 1000 nM) de la sonda reportera 5′-biotina/TTATTATT/3′-6-FAM (biomers.net, Alemania), la comparación del desempeño del tampón Cas12a producido *in house* frente al estándar comercial de referencia *HybriDetect Universal Assay Buffer* (Milenia Biotec), la temperatura de incubación (a 25 °C y 37 °C) así como el tiempo de incubación (15, 30 y 60 minutos) de la reacción Cas12a. Por último, se evaluó el impacto de la concentración final de polietilenglicol (PEG-8000) en niveles del 2%, 4% y 5%.

Una vez definidos los parámetros óptimos para la lectura por LFA, el protocolo estandarizado consistió en la dilución de 5 µL del amplicón LAMP en 101 µL de NEBuffer 2.1 (1X), suplementado con BSA (100 µg/mL) y el cofactor $MgCl_2$. En paralelo, se preparó el complejo CRISPR–Cas12a (tampón Cas12a 1X, crRNA 0.15 µM, LbCas12a 0.1 µM y sonda FAM/biotina 1000 nM), el cual se preincubó durante 10 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.

Para la fase de detección, se mezclaron 10 µL del complejo CRISPR con 90 µL del producto LAMP diluido y se incubó a 37 °C durante 1 h en oscuridad (Milenia Biotec, 2020). Finalmente, se añadieron 5 µL de PEG al 40% al tubo de reacción, el cual fue aplicado sobre las tiras LFA. El registro visual de los resultados se realizó tras un periodo de 15 min.

4.9 Sensibilidad y especificidad analítica del ensayo LAMP-CRISPR

Para evaluar la sensibilidad analítica del ensayo LAMP-CRISPR, se preparó una curva de diluciones seriadas a partir de ADNg extraído de una cepa de referencia de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). El rango de evaluación abarcó desde 5×10^4 hasta 5×10^{-3} e.g.p./reacción. La conversión de masa de ADN (ng) a e.g.p. se calculó con base en la cantidad de ADN por parásito descrita previamente (Jara et al., 2013), considerando el tamaño del genoma nuclear haploide reportado en la base de datos TriTrypDB (https://tritrypdb.org/tritrypdb/app) y el porcentaje relativo de kDNA estimado para el género *Leishmania* (Shapiro & Englund, 1995). La sensibilidad del ensayo LAMP-CRISPR para cada diana molecular (kDNA y 18S rDNA) se determinó mediante tres experimentos independientes.

La especificidad analítica se evaluó mediante el análisis de un panel de 17 muestras de cepas de referencia. Se empleó ADNg de seis cepas representativas de los subgéneros *L.* (*Viannia*) y *L.* (*Leishmania*), incluyendo especies distribuidas en el Nuevo y Viejo Mundo. Asimismo, se evaluó la posible reactividad cruzada con otro tripanosomátido filogenéticamente relacionado, *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, debido a la co-circulación de *T. cruzi* y *Leishmania* sp. en zonas endémicas rurales (Córdova et al., 2020). Además, se incluyeron patógenos de relevancia epidemiológica en Latinoamérica, como *M. tuberculosis* y *P. falciparum*, junto con ADNg humano de donantes sanos. Para estas evaluaciones, se utilizaron ADNg de entre 20 y 40 ng de cantidad inicial por reacción (equivalentes a $2.35 \times 10^5 – 4.71 \times 10^5$ e.g.p./reacción).

En cada ensayo LAMP–CRISPR se integraron controles negativos: ADNg humano extraído de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano, así como los controles del ensayo sin adición de ADN molde (NTC-LAMP y NTC-CRISPR). La especificidad molecular se validó mediante dos ensayos independientes para garantizar la reproducibilidad de la técnica.

4.10 Extracción de ADN de muestras clínicas mediante el dispositivo S-TECH

El ADNg de las 17 muestras clínicas colectadas en papel filtro se obtuvo mediante el empleo de la tecnología S-TECH (Sen et al., 2024), desarrollada por la empresa DNAiTECH Ltd (https://www.dnaitech.com/), con sede en Nueva Zelanda. Las muestras de papel filtro se transfirieron individualmente a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Cada muestra se incubó con 300 µL de tampón de lisis (2% p/v SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl pH 7.5), seguida de una agitación en vórtex durante 2 min. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 h. Se recolectó la fracción soluble, se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se calentó a 95 °C durante 10 min.

Al enfriarse a TA, se añadió una solución de acetato de potasio (un tercio del volumen total de la muestra), se agitó en vórtex y se incubó nuevamente a 95 °C durante 2 min. Posteriormente, se agregaron 500 µL de EDTA a 1 mM y las muestras se filtraron a través de una membrana del filtro S-TECH A con una jeringa de 1 mL. La elución recuperada se transfirió a un tubo nuevo de 50 mL y se mezcló con cuatro volúmenes de tampón de precipitación (6 M guanidina HCl e isopropanol al 100%). Esta mezcla se filtró a través de un filtro S-TECH B mediante una jeringa de 100 mL; este paso de filtración se repitió tres veces para asegurar la retención del ADN.

Para la purificación, el filtro se lavó secuencialmente tres veces con 1 mL de clorhidrato de guanidina 6 M en isopropanol (1:1, v/v), dos veces con 1 mL de agua ultrapura en isopropanol (1:1, v/v) y dos veces con 400 µL de etanol absoluto. El ADN se eluyó con 50 µL de agua ultrapura, se incubó durante 2 min y se recuperó con una jeringa de 1 mL en un nuevo tubo de microcentrífuga estéril. Las muestras de ADN se almacenaron a –20 °C hasta su uso posterior.

La concentración total de ADN de cada muestra se determinó por espectrofotometría (NanoDrop).

4.11 Estimación de la carga parasitaria en muestras clínicas mediante qPCR

La determinación de la carga parasitaria en las muestras clínicas se efectuó mediante qPCR dirigida al marcador kDNA empleando el kit SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Para la cuantificación se construyó una curva estándar mediante diluciones seriadas (base 10) a partir del ADNg de *L. (V.) braziliensis* M2904, en un rango de 5 × 10^4 a 5 × 10^{-3} (e.g.p./reacción). Para la detección del kDNA del subgénero *L.* (*Viannia*), se utilizaron los cebadores descritos por Jara et al. (2013): Forward 5′-GAACGGGGTTTCTGTATGC-3′ y Reverse 5′-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3′.

En cada ensayo de qPCR se incluyeron controles negativos, incluyendo un control de ADNg humano y un control sin ADN molde (NTC). Las cuantificaciones se realizaron por duplicado en ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad intra- e inter-ensayo.

La cuantificación de la carga parasitaria de cada muestra de ADN extraído a partir de lesiones clínicas se normalizó por la cantidad de ADN tisular utilizada en la reacción de qPCR, y se expresó como equivalentes genómicos de parásito por microgramo de ADN tisular (e.g.p./µg), considerando un volumen de 5 µL de muestra por reacción, según lo establecido por Jara et al. (2016), utilizando la siguiente fórmula:

$$e.g.p./\mu g = \left(\frac{equivalentes\ de\ ADN\ parasitario\ por\ reacción}{cantidad\ de\ ADN\ tisular\ por\ reacción\ (ng)}\right) x\ 10^3$$

4.12 Evaluación del panel de muestras clínicas mediante LAMP-CRISPR

Las muestras de ADN de pacientes extraídas a partir de lesiones cutáneas y de mucosas fueron evaluadas bajo un diseño en ciego mediante los ensayos LAMP-CRISPR en grupos de 5 a 6 muestras. Cada panel de muestras evaluadas incluyó dos controles positivos (5 x 10^2 e.g.p./reacción y 5 x 10^{-1} e.g.p./reacción) y dos controles negativos (NTC para la reacción LAMP). Para la preamplificación con LAMP se utilizaron 5 µL de ADN sin diluir (7–80 ng) con la finalidad de maximizar la detección en muestras con baja carga parasitaria de *Leishmania*. Finalmente, los amplicones resultantes se procesaron para su detección mediante el sistema LbCas12a

y lectura por fluorescencia o flujo lateral, siguiendo los protocolos optimizados en las secciones anteriores.

4.13 Análisis y procesamiento de la data del ensayo LAMP-CRISPR

El flujo de trabajo para la implementación y evaluación de la técnica LAMP-CRISPR aplicada a la detección molecular de *Leishmania* spp. se detalla en la Figura 6. El esquema abarca desde la obtención de la enzima recombinante hasta la interpretación de los resultados finales.

Los datos crudos de fluorescencia obtenidos mediante el software del lector de placas *Varioskan Lux* para los ensayos de LbCas12a se exportaron a Microsoft Excel para su procesamiento.

Las señales de fluorescencia cruda (*raw fluorescence*) fueron normalizadas calculando el cociente entre la señal acumulada de cada muestra y la lectura correspondiente al control sin producto (NTC) de la reacción LAMP (S/NTC), incluido en la misma placa del ensayo CRISPR-Cas12a. Este valor se definió como un *cut-off ratio*. Para la validación analítica, se establecieron como positivos aquellos resultados con un valor de ratio ≥ 2. El tiempo de lectura óptimo, determinado por la fase de saturación de la señal (fase de *plateau*) de la sonda seleccionada y el cumplimiento del valor de ratio establecido, se fijó en 10 minutos (*end-point*) para los marcadores kDNA y 18S rDNA.

El análisis estadístico y la generación de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 10.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

Debido al tamaño muestral limitado (n = 17), la comparación entre qPCR (kDNA) y LAMP-CRISPR se basó en tablas de concordancia 2×2 para evaluar los patrones de coincidencia y discordancia. El análisis descriptivo de concordancia se realizó mediante el cálculo del Acuerdo Positivo Porcentual (PPA), Acuerdo Negativo Porcentual (NPA) y Acuerdo Total (OPA). Los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) se determinaron mediante el método de Clopper-Pearson (Exacto**)** **(**Clopper CJ, Pearson ES, 1934) utilizando la plataforma MedCalc (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php), lo que permite caracterizar la concordancia mediante la evaluación de desempeño diagnóstico

(Bujang M., 2023), en estudios de tamaño muestral pequeño (n<40) (Zhou, X., Li, C., & Yang, Z et al., 2008).

Los resultados de la evaluación en tiras de LFA fueron interpretados visualmente y evaluados en ciego con respecto a los resultados de fluorescencia.

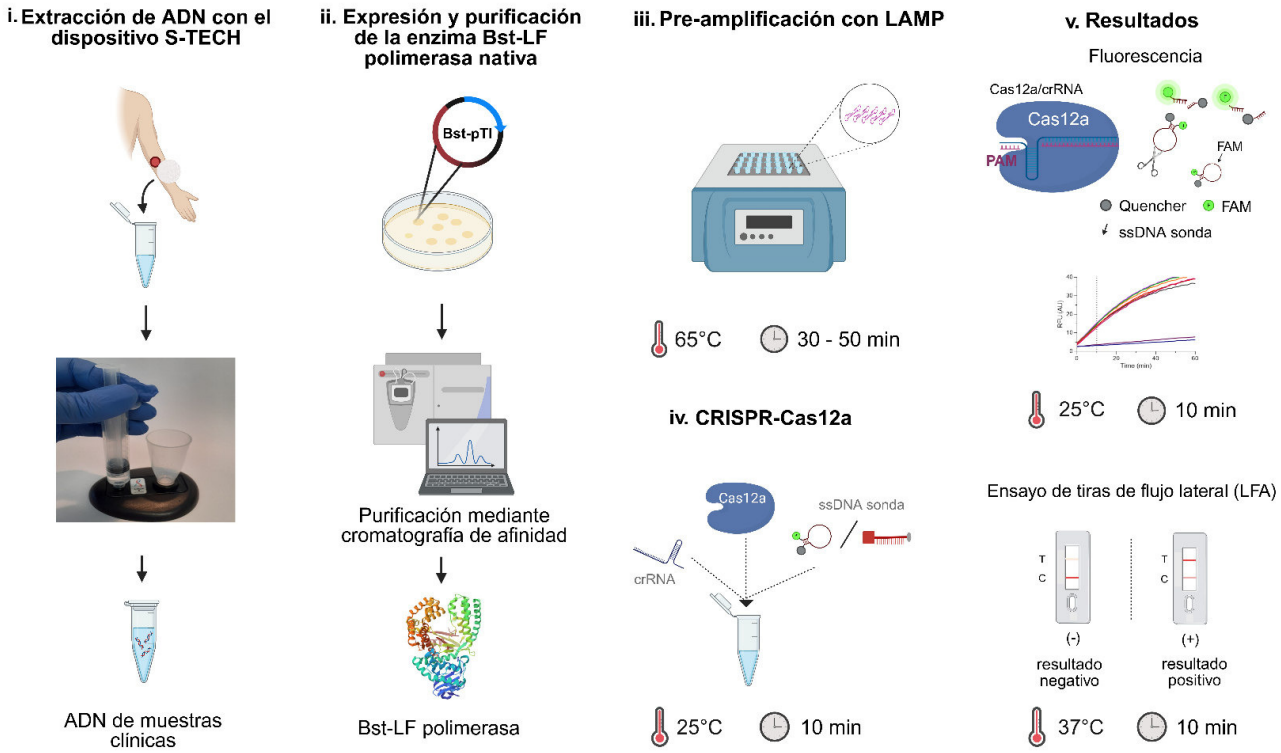


Figura 6. Esquema de las etapas de implementación y evaluación de la técnica LAMP-CRISPR aplicada a la detección molecular de *Leishmania* spp.

V. RESULTADOS

5.1 Producción local (*in house*) de la enzima recombinante ADN polimerasa Bst-LF en la cepa de *E. coli* BLR(DE3)

5.1.1 Obtención de colonias recombinantes que expresan la enzima Bst-LF ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus*

Se obtuvo una eficiencia de transformación de 1.17×10^4 UFC/µg. Además, las colonias transformantes correspondieron al 4.86% del total de UFC ajustadas por dilución (ver Anexo II). El recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó mediante el programa ImageJ. El ensayo de transformación incluyó sus respectivos controles en placas suplementadas con el antibiótico de selección (kanamicina 0.05 mg/ml), como se observa en las Figuras S3C y S3D.

El control negativo correspondiente a la cepa *E. coli* BLR(DE3) carente del plásmido recombinante no mostró crecimiento bajo presión selectiva (Figura S3A), mientras que el control de viabilidad (cepa parental en medio sin antibiótico) confirmó el estado fisiológico óptimo de las células competentes (Figura S3B). Las placas de las células transformadas mostraron un crecimiento colonial característico (Figuras S3C y S3D).

Adicionalmente, se corroboró la identidad de los clones transformantes obtenidos; se realizó una PCR de colonia dirigida a la región del promotor T7 en cuatro colonias recombinantes seleccionadas al azar. La amplificación exitosa en todos los clones (Figura S4, Anexo II) corroboró la presencia del plásmido recombinante, por lo que estas colonias fueron seleccionadas para los ensayos de expresión de la proteína ADN polimerasa Bst-LF.

5.1.2 Expresión analítica de la proteína Bst-LF ADN polimerasa de *G. stearothermophilus*

La inducción analítica de la proteína Bst-LF recombinante se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12.5 % y tinción con azul de Coomassie. En el perfil proteico se observó una banda prominente con una masa molecular aparente de 67.5 kDa (Figura 7), coincidente con el peso teórico esperado para la enzima. Para la estimación del tamaño se empleó el marcador de proteínas *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (116-14.4 kDa) (Thermo Scientific).

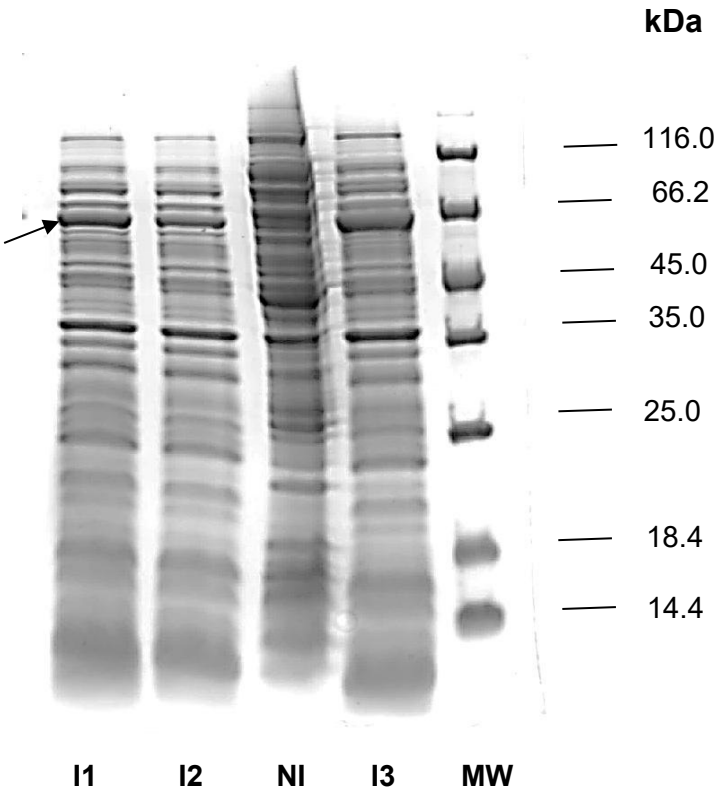


Figura 7. Análisis de la expresión de la proteína Bst-LF mediante SDS-PAGE. I1: Inducción con 0.5 mM IPTG, I2: Inducción con 0.4 mM IPTG, I3: Inducción con 1 mM IPTG, NI: muestra no inducida con IPTG, MW: marcador de peso molecular de proteínas sin teñir (116-14.4 kDa). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína Bst-LF con una masa molecular aparente de 67.5 kDa.

5.1.3 Expresión y purificación de la proteína Bst-LF de *G. stearothermophilus* a escala preparativa

Tras el proceso de purificación y el recambio de la solución tampón, la concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford utilizando BSA como estándar, mediante el cálculo de regresión lineal con factor de dilución de 2; se obtuvo una concentración final aproximada de ~200 µM a partir de 500 ml de cultivo de *E. coli*. La identidad y pureza de la enzima Bst-LF se verificaron mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12.5 %. Se observó una banda prominente a la altura de 67.5 kDa, correspondiente al peso molecular teórico de la proteína Bst-LF, utilizando como referencia el marcador de peso molecular de proteínas *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (250 – 10 kDa) (Figura 8).

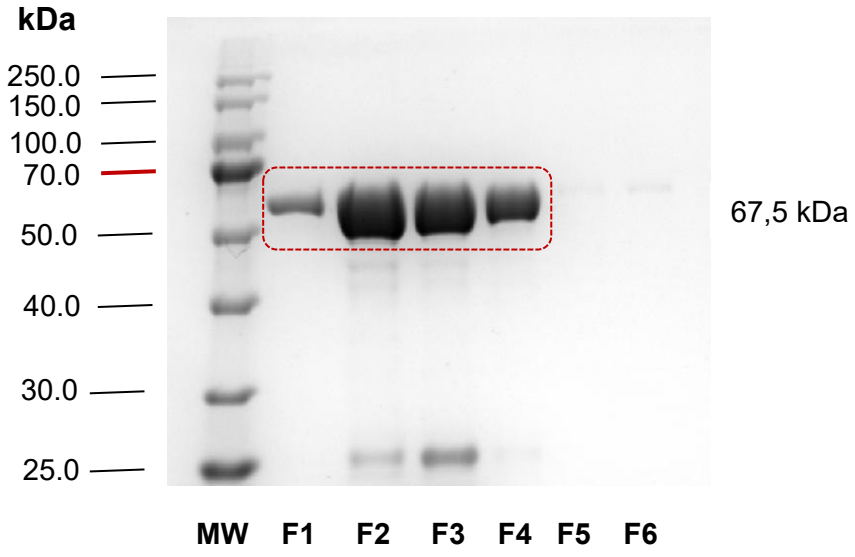


Figura 8. Proceso de purificación por cromatografía de afinidad NTA-Ni/His-Tag en gel SDS-PAGE al 12.5%. MW: Marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler™ Plus prestained protein ladder, 250 – 10 kDa); F1, F2, F3, F4: fracciones de obtención de Bst-LF purificada (67.5 kDa).

5.2 Optimización y validación analítica de la reacción LAMP-CRISPR

La estandarización de la técnica LAMP-CRISPR se realizó comparando el desempeño de la enzima comercial Bst 2.0. Los productos generados en la reacción LAMP se emplearon en la reacción CRISPR subsiguiente para su detección.

5.2.1 Estandarización de los tiempos de incubación de la reacción LAMP

Para el marcador kDNA, se evaluaron cuatro tiempos de incubación: 10, 20, 30 y 40 min (Figura 9-D) utilizando la enzima comercial Bst 2.0 a 5 mM de $MgSO_4$. Se observó amplificación a partir de los 10 min en la muestra de ADNg de *L. braziliensis* M2904 presente en alta cantidad (2×10^2 e.g.p./reacción; Figura 9A), mientras que la muestra con menor cantidad de ADN diana (2×10^{-1} e.g.p./reacción) requirió al menos 20 min (Figura 9B). Por otro lado, si bien un tiempo de incubación de 40 min permitió la amplificación del ADN diana presente en cantidades muy bajas (2×10^{-3} e.g.p/reacción), se observó una señal positiva en el control sin ADN molde (NTC-LAMP), lo que sugiere contaminación o formación de productos inespecíficos (Figura 9D). Por lo tanto, se seleccionó un tiempo de incubación de 30 min como el óptimo para el marcador kDNA (Figuras 9C y 9E) en los experimentos posteriores.

Para el gen 18S rDNA, la evaluación incluyó tiempos de incubación de 10, 30, 40, 50 y 60 min (Figura 9G-K), con 6 mM $MgSO_4$ de cantidad. La amplificación de las concentraciones intermedias (2×10^{-2} y 2×10^{-1} e.g.p./reacción) se evidenció a partir de los 40 min (Figura 9I). Aunque la incubación de la reacción LAMP a 60 min permitió detectar la mínima concentración (2×10^{-3} e.g.p./reacción), se presentó inespecificidad en una de las dos réplicas del control NTC (Figura 9J).

Sobre la base de estos resultados, se estableció un tiempo de incubación de 50 min como óptimo para el marcador 18S (Figuras 9K y 9I) para experimentos posteriores.

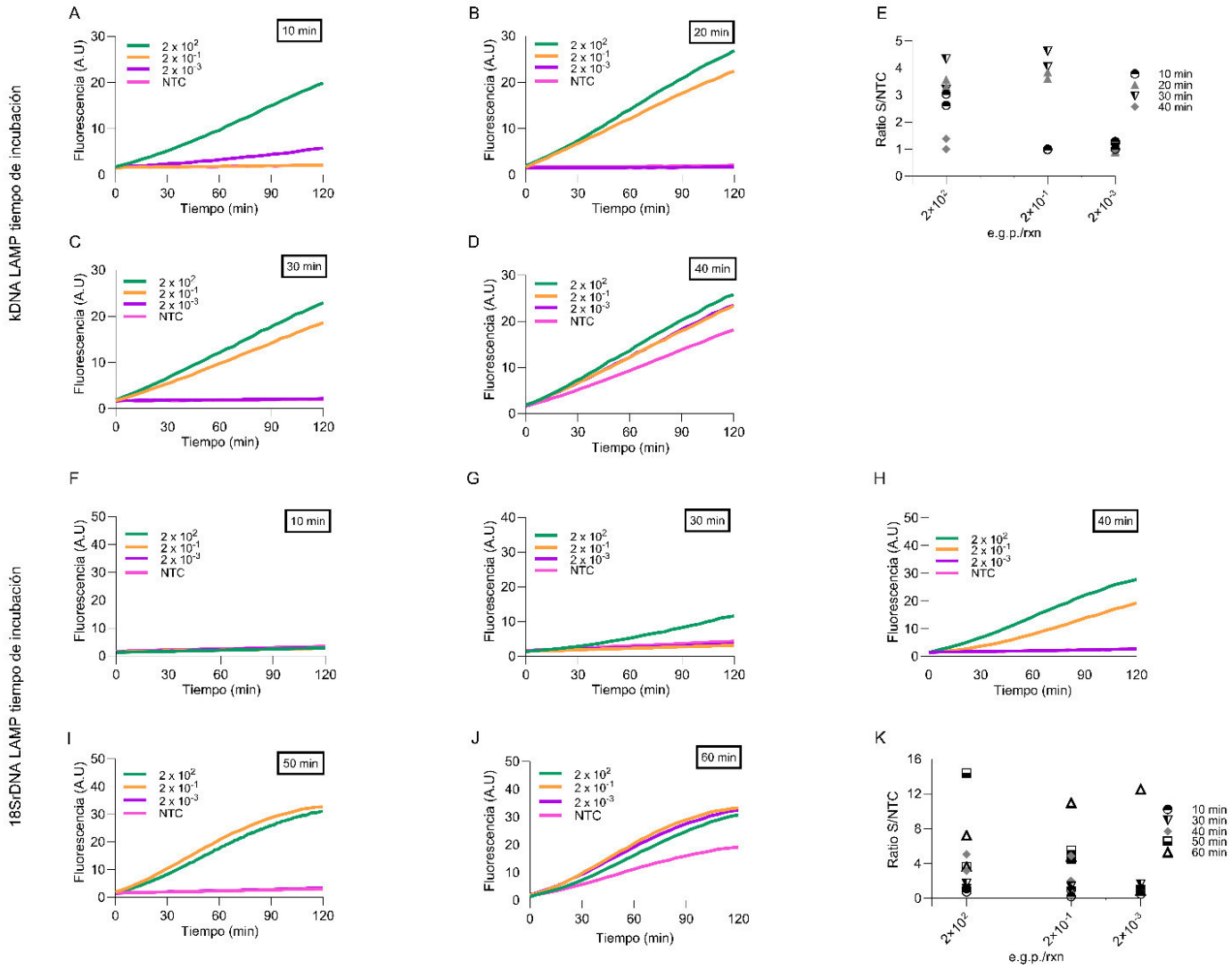


Figura 9. Optimización del tiempo de incubación de la reacción LAMP. Se evaluaron diferentes tiempos de reacción para las dianas kDNA de *Leishmania* (10, 20, 30 y 40 min) y 18S rDNA (10, 30, 40, 50 y 60 min). La eficiencia de amplificación se analizó usando distintas cantidades de ADN molde de *L. braziliensis* (2×10^{2}, 2×10^{-1} y 2×10^{-3} e.g.p./reacción) y un control negativo (NTC). Se presentan las señales de fluorescencia (RFU) crudas y normalizadas (t = 25 min). El umbral de positividad se estableció en una relación de fluorescencia ≥ 2. Imagen obtenida de Dueñas et al. (2026).

5.2.2 Determinación de la concentración óptima de Bst-LF polimerasa recombinante para la reacción LAMP

Se realizó la optimización de la reacción LAMP utilizando la enzima Bst-LF ADN polimerasa producida *in house*, mediante una curva de concentración enzimática en un rango de 20 a 2×10^{-4} µM, empleando diluciones seriadas con un factor de 10 (Figura 10A). Posteriormente, se refinó la búsqueda entre 2×10^{-2} y 2×10^{-3} µM utilizando un factor de dilución de 2 (Figura 10B). La positividad se determinó mediante la relación de fluorescencia señal/control negativo (S/NTC), con un umbral (*cut-off* ≥ 2). La concentración mínima de Bst-LF que permitió la detección del amplicón específico de kDNA mediante el ensayo CRISPR-Cas12a fue de 0.01 µM (Figura 10B). No obstante, para asegurar una amplificación robusta, reproducible y con un tiempo de incubación de la reacción LAMP de 30 min, se estableció una concentración final de 0.2 µM de Bst-LF por reacción (equivalente a 5 pmol). Esta saturación controlada de la enzima permite asegurar la eficiencia del ensayo frente a posibles inhibidores o variaciones en la calidad del ADN molde (Figura 10B).

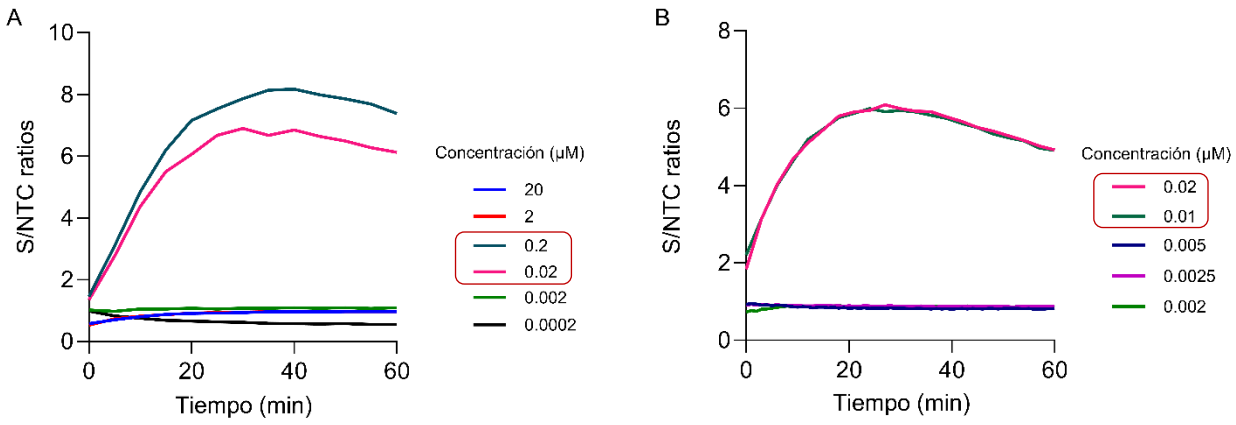


Figura 10. Curva de estandarización de la concentración enzimática para la reacción LAMP utilizando la diana kDNA de *Leishmania* spp. Los resultados se expresan como la razón de fluorescencia (ratio) respecto al control sin molde (Ratios S/NTC). El umbral de positividad se estableció en una razón ≥ 2. (A) Curva de dilución con factor 10. (B) Curva de dilución con factor 2 para la determinación de la concentración mínima funcional y óptima.

5.2.3 Optimización de la concentración de $MgSO_4$

La concentración de $MgSO_4$ es un parámetro crítico en la reacción LAMP, ya que los iones Mg^{2+} actúan como cofactores esenciales para la actividad de la ADN polimerasa Bst-LF y estabilizan la hibridación de los cebadores (Vashishtha A. & Konigsberg W., 2018). Se evaluó una curva de concentraciones de $MgSO_4$ específica para cada marcador molecular, utilizando la enzima Bst-LF recombinante producida *in house*.

Para el kDNA, se ensayaron concentraciones de 5.8, 6.3, 6.8, 7.3 y 7.8 mM de $MgSO_4$. Los resultados mostraron que una concentración de 6.8 mM permitió alcanzar la mayor eficiencia de amplificación en el tiempo óptimo de 30 min, con una relación señal/control negativo (S/NTC) superior a 3. Concentraciones mayores a 7 mM mostraron una ligera disminución en la intensidad de la señal de fluorescencia, posiblemente debido a efectos inhibitorios por exceso del cofactor. En consecuencia, se estableció una concentración final de 6.8 mM para los ensayos dirigidos al kDNA (Figura 11A).

En el caso del 18S rDNA, se evaluaron concentraciones de 5.8, 7.8, 9.8 y 11.8 mM de $MgSO_4$. Se determinó que el sistema requiere una mayor concentración del cofactor Mg^{+2} para este marcador, identificándose la concentración de 7.8 mM como la óptima para obtener una señal robusta y reproducible (Figura 11B).

Estos resultados demuestran que, si bien ambos ensayos utilizan la misma enzima Bst-LF, los requerimientos iónicos varían según la complejidad de la secuencia diana y el diseño de los cebadores. Se requirió una mayor concentración de magnesio para estabilizar la amplificación del gen que codifica el ARN ribosomal 18S.

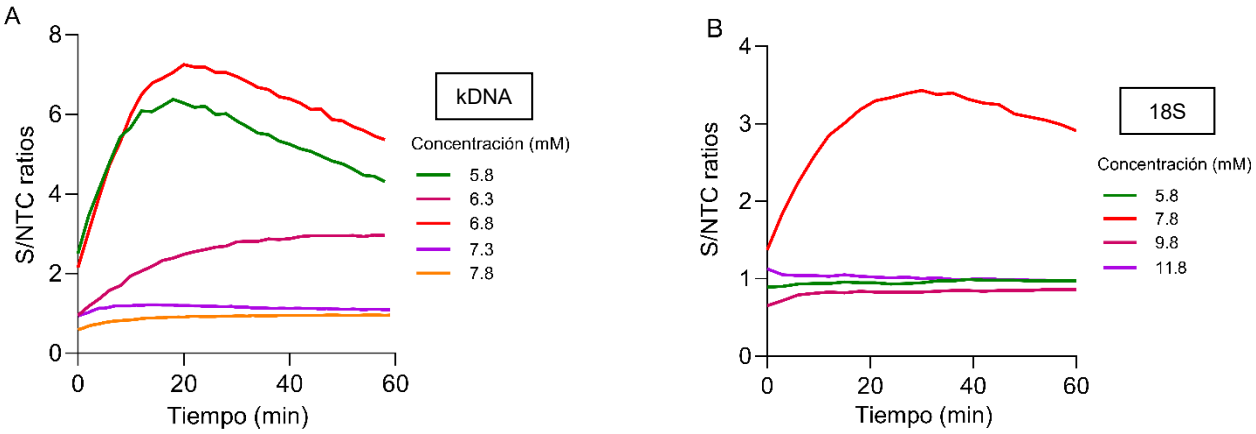


Figura 11. Curvas de concentración de $MgSO_4$ para la amplificación de las dianas kDNA y 18S de *Leishmania* spp. Se muestra la razón de fluorescencia de las reacciones (ratios S/NTC) ($r \geq 2$, resultado positivo), durante 1 h de lecturas sucesivas en intervalos de 1 min. El umbral de positividad se estableció en una razón ≥ 2. (A) Concentración óptima de 6.8 mM de $MgSO_4$ para kDNA. (B) Concentración óptima de 7.8 mM de $MgSO_4$ para 18S.

5.2.4 Estandarización de lecturas de sonda fluorescente

En la optimización de las lecturas obtenidas con la reacción CRISPR, se evaluó el desempeño de tres sondas reporteras de fluorescencia (λ excitación: 490 nm, λ emisión: 525 nm). El propósito de esta comparación fue identificar una señal diferencial significativa (*cut-off* ratio ≥ 2) entre las lecturas de muestras con ADN de *Leishmania* y el NTC-LAMP, observable en el menor tiempo de reacción posible.

Tras los ensayos, se seleccionó la sonda tipo hairpin (6-FAM)-CTCTCATTTTTTTTTAGAGAG-(BHQ1) (Rossetti et al., 2022), debido a que presentó un tiempo de saturación de la señal inferior al de las otras dos sondas. Este análisis se validó tanto para el marcador kDNA (Figura 12A) como para el marcador 18S (Figura 12B). Los resultados demuestran que solo 10 minutos de lectura en el

equipo *Varioskan LUX* son suficientes para alcanzar una razón de fluorescencia (r≥2) entre el control positivo (5 x 10^2 e.g.p./reacción) y el control negativo (NTC).

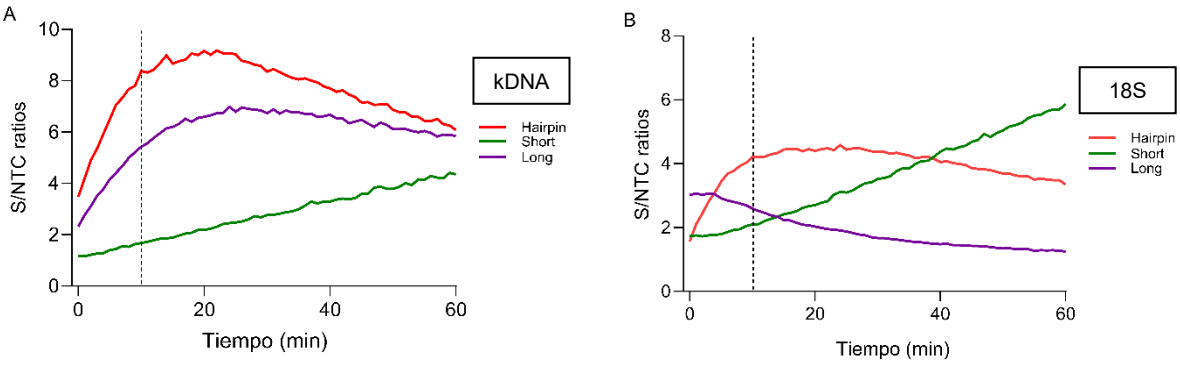


Figura 12. Comparación de sonda fluorescente para el sistema LAMP-CRISPR. Se presentan las razones de fluorescencia (ratios S/NTC) durante 60 minutos. El umbral de positividad se definió como el *ratio* ≥ 2. El análisis evalúa el desempeño de las sondas de detección de (A) Marcador kDNA y (B) Marcador 18S rDNA.

5.3 Optimización de los ensayos LAMP-CRISPR en el formato de LFA (Lateral Flow Assay)

La optimización de la reacción combinada LAMP-CRISPR se realizó con la diana kDNA, empleando la enzima Bst 2.0, un control positivo de 5 × 10^2 e.g.p./reacción de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 y un sistema de lectura basado en tiras de LFA, Dichas variables permitieron definir las condiciones para la interpretación visual de los resultados.

Un resultado positivo indica que la enzima Cas12a escindió la sonda FAM–biotina, separando ambos marcadores. Como consecuencia, el fragmento marcado con biotina interactúa con la estreptavidina presente en la banda control (C), mientras que el marcador FAM interactúa con las nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-FAM/FITC (*GNPs with rb anti-FAM/FITC*), lo que permite la visualización de la banda de prueba (T). En un resultado negativo, Cas12a no escinde la sonda FAM–biotina, por lo que esta permanece íntegra y su interacción con

estreptavidina impide la aparición del patrón correspondiente a una muestra positiva (Figura 13A).

Se determinó que el uso de una sonda FAM–biotina a una concentración final de 100 nM (1X), del buffer *in house*, la incubación a 37 °C durante 1 h y la adición de PEG-8000 al 2% permitieron reducir significativamente la señal de fondo (*background*) en el control negativo (NTC) (Figura 13B–F). En conjunto, estas condiciones garantizan una diferenciación visual sin ambigüedades entre la línea control (C) y la línea de prueba (T).

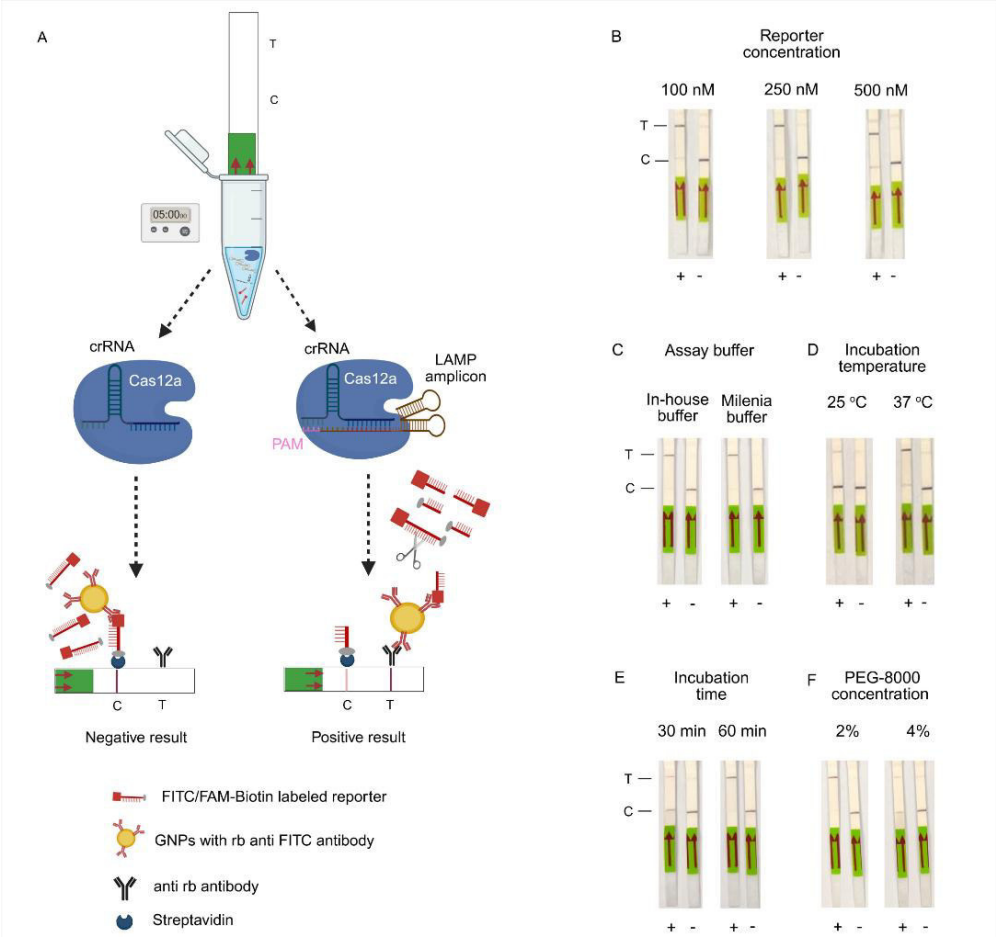


Figura 13. Optimización de ensayos de detección basados en CRISPR utilizando lectura por flujo lateral (LFA). A. Diseño de las tiras de prueba *Milenia GenLine HybriDetect* e interpretación de los resultados. B-F. Evaluación de parámetros críticos: (B) concentración de la sonda reportera, (C) comparación de tampones (comercial vs. *in house*), (D) temperatura de incubación, (E) tiempo de reacción de Cas12a, y (F) efecto de la adición de PEG-8000. C: línea control; T, línea de prueba (*template*). Imagen obtenida de Dueñas et al. (2026).

5.4 Análisis de sensibilidad analítica para los marcadores kDNA y 18S rDNA

La sensibilidad analítica de la combinación de cebadores (primers) y el crRNA, utilizando la enzima Bst-LF *in house*, se determinó mediante el empleo de diluciones seriadas de ADNg de *L. (Viannia) braziliensis* M2904. El ensayo LAMP-CRISPR dirigido al marcador kDNA alcanzó un límite de detección de hasta 5×10^{-2} e.g.p./reacción. Este resultado fue consistente en ambas modalidades de detección, tanto mediante lectura por fluorescencia (con tres ensayos independientes) (Figura 14A) como por flujo lateral (LFA) (con dos ensayos independientes, r1 y r2) (Figura 14C). De igual manera, el ensayo dirigido al marcador 18S exhibió la misma sensibilidad de detección (5×10^{-2} e.g.p./reacción) bajo ambos métodos de lectura (Figuras 14B y 14D).

Cabe destacar que el control negativo para LAMP (NTC) no mostró reactividad (o presentó una señal imperceptible) en la línea de prueba (T) de las tiras de flujo lateral (Figuras 14C y 14D). Estos resultados descartan la presencia de contaminación cruzada y confirman la ausencia de amplificación inespecífica en las condiciones optimizadas.

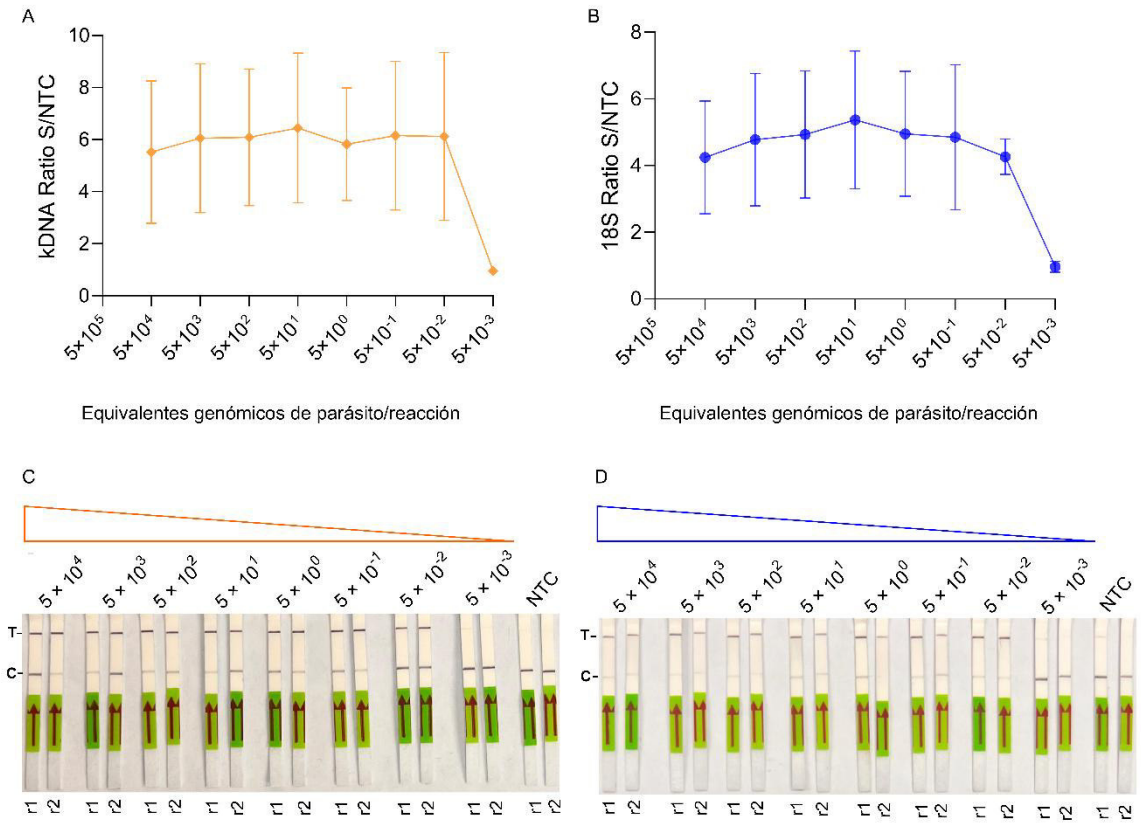


Figura 14. Determinación de la sensibilidad analítica de los ensayos LAMP–CRISPR para la detección de *Leishmania* spp. **(**A, B) Lecturas de fluorescencia normalizadas (S/NTC) registradas a t = 10 min; los datos presentan la media ± SD (n = 3 experimentos independientes). (C, D) Ensayos representativos de flujo lateral (LFA) empleando una sonda reportera marcada con FAM-biotina (r1 y r2: repeticiones independientes). (A, C) Marcador kDNA; (B, D) Marcador 18S rDNA. C, línea de control; T, línea de prueba.

5.5 Análisis de la especificidad analítica de los ensayos LAMP-CRISPR

La especificidad analítica se determinó utilizando muestras de ADNg de cepas de referencia de *Leishmania* spp., de patógenos filogenéticamente relacionados y de agentes infecciosos con manifestaciones clínicas similares a la LTA o reportados en casos de coinfección (Tabla 2).

El ensayo LAMP-CRISPR dirigido al marcador kDNA detectó con éxito la totalidad de las cepas pertenecientes al subgénero *L. (Viannia),* incluidas en el estudio (10/10; Figura 15A). Este hallazgo es consistente con el diseño del kDNA-crRNA, el cual se dirige a una región de los minicírculos de kDNA altamente conservada en dicho subgénero (Figura S1). Asimismo, se observó reactividad en 2 de las 6 cepas evaluadas del subgénero *L. (Leishmania)* (Figura 15A).

Por el contrario, el ensayo basado en el marcador 18S LAMP–CRISPR demostró una capacidad de detección pan-*Leishmania* (Figura 15B), validando los análisis de homología realizados *in silico* (Figura S2). En ambos ensayos (kDNA y 18S), no se registró reactividad cruzada con *T. cruzi, P. falciparum* ni *M. tuberculosis*. Asimismo, el ADNg humano no mostró señal de amplificación (control negativo) (Figura 15).

La especificidad fue confirmada mediante el formato de lectura de LFA. Los controles negativos (ADNg humano y NTC) mostraron únicamente la banda control (C). En concordancia con los ensayos de fluorescencia, el formato LFA no evidenció reactividad cruzada con ninguno de los patógenos evaluados (Figuras 15C y 15D).

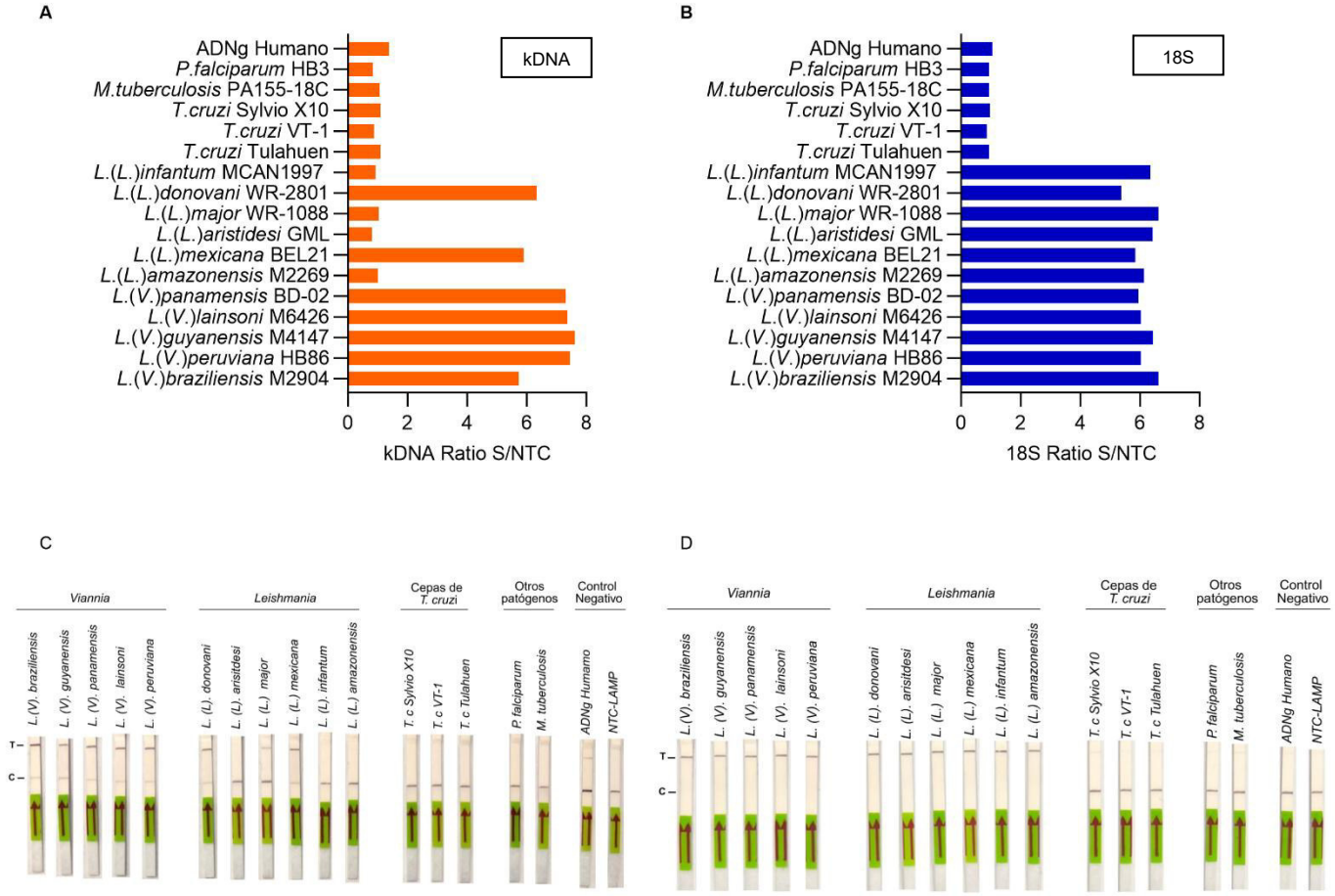


Figura 15. Especificidad analítica de los ensayos LAMP-CRISPR. Evaluación del panel de 17 muestras de ADN de referencia de diversos patógenos y controles. (A, B): Cinética de fluorescencia normalizada (S/NTC) a los 10 min de reacción. Los datos representan la media ± SD (n = 2 ensayos independientes). (C, D): Validación de los resultados mediante tiras LFA. (A, C) Análisis del marcador kDNA; (B, D): Análisis del marcador 18S rDNA. C: línea de control; T: línea de prueba.

5.6 Evaluación del desempeño de los ensayos LAMP-CRISPR en muestras clínicas

Como método de referencia para el análisis de las muestras clínicas procesadas mediante el dispositivo S-TECH (n= 8 lesiones cutáneas, 5 lesiones mucosas y 4 controles procedentes de zonas endémicas), se empleó un ensayo de qPCR dirigido a una región conservada del ADN del kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania (Viannia)*. Este ensayo fue

descrito previamente por Jara et al. (2013) y se basa en los cebadores reportados por López et al. (1993).

De las 17 muestras clínicas analizadas, la qPCR detectó señal (valores de Cq detectados) en 14 casos. De estas, 9 fueron clasificadas como detectadas y cuantificables, mientras que 5 fueron clasificadas como detectadas, pero no cuantificables (*Below the limit of quantification***,** BLOQ) (Hedman et al., 2018), debido a que presentaron amplificación fuera del rango dinámico lineal de la curva estándar (Cq ≥ 32). Este fue el caso de las muestras con código M2, M6, M8, M14 y M16. Las 3 muestras restantes no presentaron un valor de Cq definido ni una curva de *melting* específica correspondiente al producto de amplificación del kDNA de *Leishmania* spp. En particular, dichas muestras (códigos: M7, M10 y M17) no alcanzaron el umbral de fluorescencia en la qPCR y, por tanto, fueron consideradas no detectables (Figura 16, Tabla 3).

El ensayo kDNA LAMP–CRISPR mostró alta concordancia con la qPCR dentro del subconjunto de muestras detectadas y cuantificables, identificando 8 de 9 muestras positivas y la totalidad de las muestras no detectadas (3/3) (Figura 16, Tabla 2). La muestra discordante en este subconjunto (qPCR positiva / LAMP–CRISPR negativa; código: M13) presentó una baja carga parasitaria (2.13×10^{-1} e.g.p./µg). Esta muestra proviene de una lesión de mucosa clasificada como curada (Figura 17A, Tabla 3).

Por su parte, el ensayo 18S LAMP–CRISPR detectó 4 de las 9 muestras positivas y cuantificables por qPCR dirigida a kDNA, así como la totalidad de las muestras no detectadas por qPCR (3/3) (Figura 16, Tabla 2). Las muestras no detectadas por este marcador presentaron cargas parasitarias dentro de un rango de 2.51×10^{2} a 2.13×10^{-1} e.g.p./µg (Figura 17B, Tabla 3).

Adicionalmente, las 5 muestras clasificadas como BLOQ por qPCR resultaron negativas para ambos marcadores en LAMP–CRISPR. Dado que estas muestras se encontraban fuera del rango de cuantificación validado (Cq ≥ 32) (Tabla 3).

Al comparar el desempeño de la técnica LAMP-CRISPR para el marcador kDNA frente al estándar qPCR, se obtuvo un acuerdo positivo porcentual (PPA) del 57.1% (IC

95%: 28.9% – 82.3%). Esto evidencia el límite de detección en muestras de leishmaniasis mucosa con baja carga parasitaria. No obstante, el ensayo demostró robustez en la identificación de casos negativos, alcanzando un acuerdo negativo porcentual (NPA) del 100% (IC 95%: 29.2% – 100%), sin registrarse falsos positivos. Finalmente, el acuerdo total (OPA) entre ambos métodos fue del 64.7%. Se observó una detección confiable con el ensayo kDNA LAMP-CRISPR en muestras con cargas parasitarias superiores a 1.30 x 10^{-1} e.q.p./µg (Tabla 4).

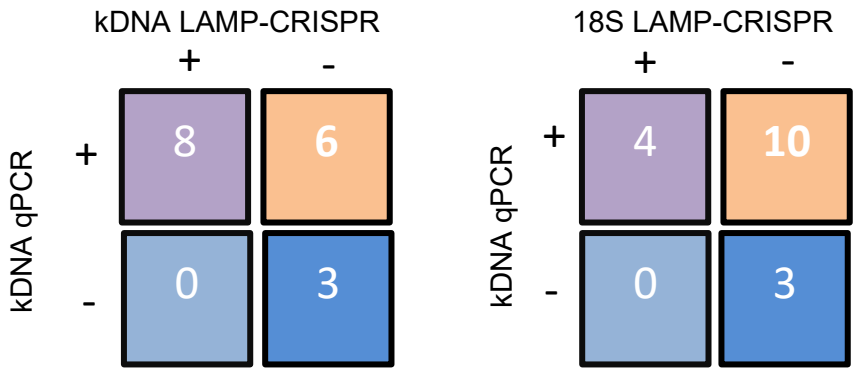


Figura 16. Análisis de concordancia del panel clínico. Comparación de resultados entre los ensayos qPCR-kDNA y LAMP–CRISPR dirigidos a los marcadores kDNA y 18S rDNA en 17 muestras.

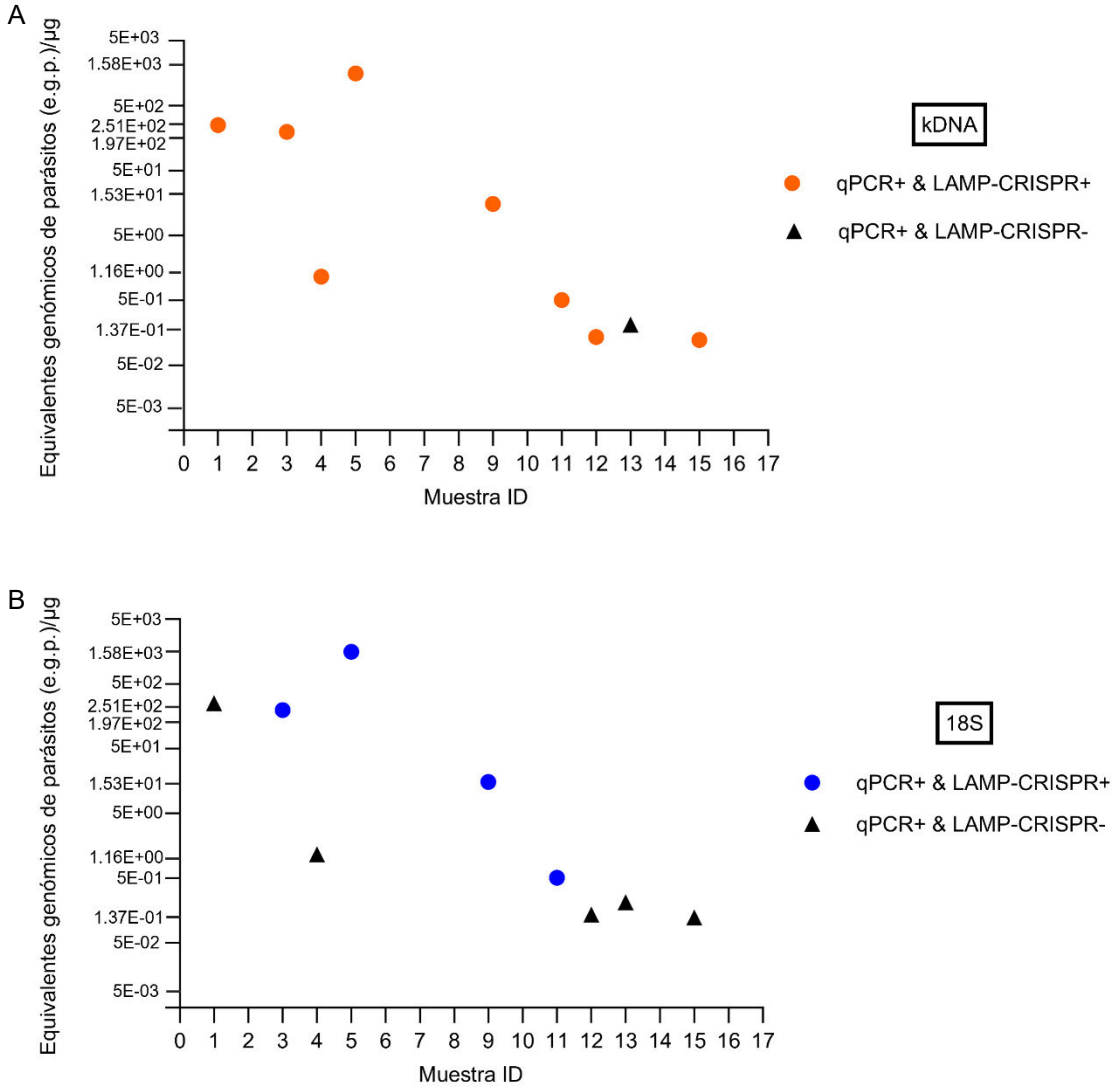


Figura 17. Análisis de concordancia de las muestras clínicas en función de la carga parasitaria (e.g.p/µg), del subgrupo de muestras que resultaron detectadas y cuantificables por qPCR dirigida al marcador kDNA. (A) Los resultados del ensayo kDNA LAMP-CRISPR versus la qPCR de referencia evidenciaron una única muestra discordante (qPCR+/LAMP-CRISPR−), correspondiente a la muestra M13 con una carga parasitaria de 1.30×10^{-1} e.g.p/µg. (B) El análisis de resultados del ensayo LAMP-CRISPR dirigido a 18S rDNA respecto a la qPCR arrojó seis muestras discordantes (qPCR+/LAMP-CRISPR−), incluyendo la muestra M1 con una carga parasitaria de 2.51×10^{2} e.g.p/µg y otras muestras con cargas parasitarias inferiores a 1.16×10^{0} e.g.p/µg.

Tabla 3. Resultados de las 17 muestras clínicas evaluadas mediante ensayos de qPCR, y LAMP–CRISPR para la detección molecular de *Leishmania* spp. (1: positivo, 0: negativo). NC**: muestra clasificada como detectada pero no cuantificable. *Y: concordancia; N: no concordancia.

Pacientes ID	Diagnóstico clínico	kDNA qPCR			kDNA LAMP-CRISPR	18S LAMP-CRISPR	*Concordancia (kDNA)	Concordancia 3 tests
		Estatus	Cq (promedio)	Carga parasitaria (e.g.p/µg)				
1	Lesión activa cutánea	Detectada	19.23	2.51E+02	1	0	Y	N
2	Lesión activa cutánea	NC**	33.19	-	0	0	N	N
3	Lesión activa cutánea	Detectada	19.79	1.97E+02	1	1	Y	Y
4	Lesión activa cutánea	Detectada	27.47	1.16E+00	1	0	Y	N
5	Lesión activa cutánea	Detectada	15.21	1.58E+03	1	1	Y	Y
6	Infección curada cutánea	NC**	33.00	-	0	0	N	N
7	Control endémico	Negativo	N/A	N/A	0	0	Y	Y
8	Control endémico	NC**	32.36	-	0	0	N	N
9	Control endémico	Detectada	23.67	1.53E+01	1	1	Y	Y
10	Control endémico	Negativo	N/A	N/A	0	0	Y	Y
11	Lesión activa en mucosas	Detectada	27.29	5.09E-01	1	1	Y	Y
12	Lesión activa en mucosas	Detectada	30.17	1.37E-01	1	0	Y	N
13	Infección curada de mucosa	Detectada	31.19	2.13E-01	0	0	N	N
14	Infección curada cutánea	NC**	32.65	-	0	0	N	N
15	Infección curada cutánea	Detectada	29.84	1.30E-01	1	0	Y	N
16	Infección curada de mucosa	NC**	32.2	-	0	0	N	N
17	Infección curada de mucosa	Negativo	N/A	N/A	0	0	Y	Y

Tabla 4. Análisis de concordancia para la detección de *Leishmania* spp. entre el ensayo LAMP-CRISPR y la prueba molecular de referencia qPCR dirigida al marcador kDNA. PPA: acuerdo positivo porcentual; NPA: acuerdo negativo porcentual.

Test	kDNA qPCR		% (IC 95%)	
	Detectada (n = 14)	No detectada (n = 3)	PPA	NPA
kDNA LAMP-CRISPR			57.1 (28.9 – 82.3)	100 (29.2 - 100)
Positivo	8	0		
Negativo	6	3		

https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php

Finalmente, se evaluó el desempeño del ensayo LAMP–CRISPR aplicado al panel de muestras clínicas mediante LFA. Las muestras abarcaron un amplio rango de cargas parasitarias, previamente cuantificadas mediante qPCR dirigida a kDNA. Para ilustrar la comparación entre ambas técnicas, en la Figura 17 se presentan los valores promedio de Cq obtenidos por qPCR y su contraste con los resultados del ensayo LAMP–CRISPR mediante lectura por fluorescencia.

Los resultados evidenciaron una concordancia del 100% entre la lectura visual por LFA y la lectura por fluorescencia en los ensayos de LAMP-CRISPR para ambos marcadores. Asimismo, los controles positivos (PC1 y PC2) que proceden de ADNg de una cepa de parásitos de referencia (*L. (V) braziliensis* M2904) correspondientes a 5 x 10^2 y 5 x 10^{-1} e.g.p./reacción, respectivamente. Las dos muestras provenientes de pacientes controles no afectados por leishmaniasis (C1 y C2) validaron la especificidad del formato LFA al coincidir con los resultados de la qPCR-kDNA (Figura 18).

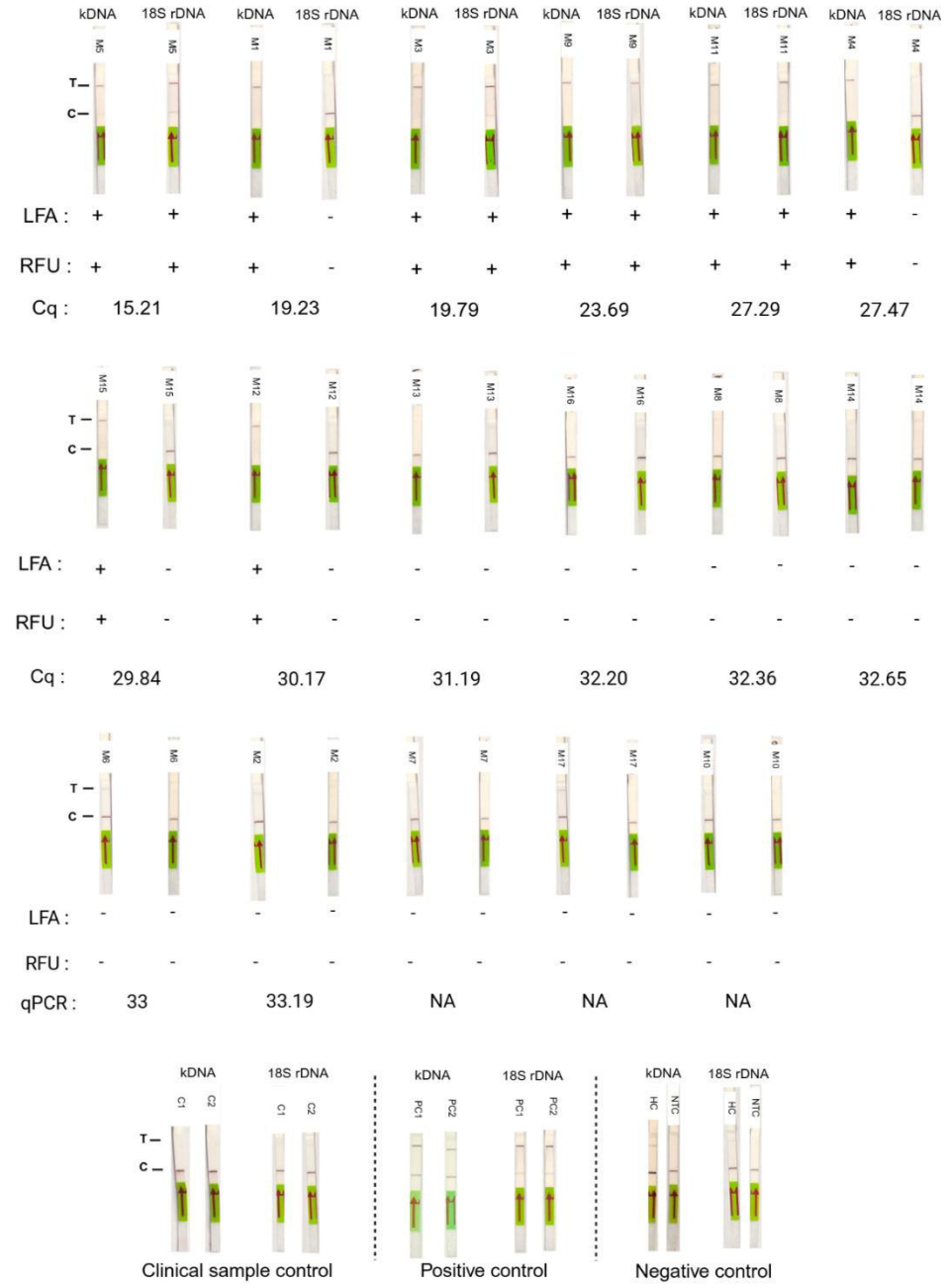


Figura 18. Evaluación de los ensayos LAMP–CRISPR dirigidos a kDNA y 18S en muestras clínicas mediante lectura por flujo lateral. Comparativa de los resultados cualitativos por LFA frente a los valores de Cq (qPCR-kDNA) y niveles de fluorescencia (RFU) (+, detectado; −, no detectado). C1 y C2: Muestras de pacientes no infectados (negativas por qPCR); PC: Control positivo (5 × 10^2 e.g.p./reacción de *L. braziliensis* M2904); HC: ADNg humano (20 ng, cantidad de ADNg inicial); NTC: Control sin ADN diana. C: línea de control; T: línea de prueba.

VI. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó, como prueba de concepto, la implementación de la técnica LAMP acoplada a CRISPR-Cas12a para la detección molecular de *Leishmania* spp., mediante dos marcadores multicopia: kDNA y 18S rDNA. El flujo de trabajo diseñado busca establecer el uso de una plataforma portátil que emplea enzimas de producción local, la toma de muestra mínimamente invasiva en papel de filtro, un método de extracción de ADN independiente de kits comerciales y de equipos especializados, seguida de su detección utilizando tiras reactivas de flujo lateral. Bajo este enfoque, el ensayo LAMP-CRISPR mostró una alta concordancia con la prueba de referencia (qPCR) en muestras de lesiones cutáneas y mucosas con infección activa, así como en muestras clasificadas como negativas (Tabla 3). Además, se observó consistencia entre los dos formatos de lectura evaluados: fluorescencia y flujo lateral (LFA).

Estos hallazgos respaldan el potencial de las plataformas de diagnóstico molecular de siguiente generación para su aplicación en enfermedades desatendidas. Este enfoque no sólo busca aproximarse al concepto de diagnóstico cercano al punto de atención (*near-PoC*) donde la portabilidad es clave en entornos de recursos limitados (Gow et al., 2022), sino que también ofrece una prueba altamente específica gracias a la versatilidad de la tecnología CRISPR Dx (CRISPR para diagnóstico) (Zhou et al., 2024; Li et al., 2023).

6.1 Obtención y validación de la enzima recombinante Bst-LF ADN polimerasa

Un factor importante para la sostenibilidad de la prueba LAMP-CRISPR es la producción local de reactivos. En esa línea, la producción *in house* de Bst-LF representa una alternativa práctica frente al uso de enzimas comerciales por su impacto en costo y escalabilidad (San Pedro et al., 2025; Paik et al., 2023; Li et al., 2023).

En el presente estudio, la obtención de Bst-LF se realizó a partir de 500 mL de cultivo líquido, alcanzando un rendimiento de 200 µM de enzima mediante un protocolo de purificación optimizado basado en lo reportado por Paik et al. (2023) y Rivera et al. (2020). Se determinó que una concentración de enzima de 0.01 µM (0.25 pmol para 25

µL de mix de LAMP) es suficiente para garantizar la eficiencia de la reacción (Figura 10). Este resultado es consistente con reportes previos que emplearon concentraciones similares de Bst-LF producida *in house* para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-LAMP (San Pedro et al., 2025; Matute et al., 2021) y para ensayos de LAMP con formatos de detección específicos basados en sondas OSD (*Oligonucleotide Strand Displacement*) (Paik et al., 2023).

Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo son satisfactorios, diversos autores enfatizan que la optimización de las propiedades enzimáticas de la Bst-LF, como la actividad catalítica, la termoestabilidad, la solubilidad y la tolerancia a inhibidores, es crucial para su aplicación en entornos clínicos y en condiciones no controladas (Paik et al., 2023; Li et al., 2023). Al respecto, Paik et al. (2023) implementaron estrategias de ingeniería de proteínas para solucionar problemas de solubilidad durante la purificación y la necesidad de aumentar la termoestabilidad y mejorar la termotolerancia sin comprometer el plegamiento proteico mediante fusión de dominios y sustituciones predichas.

Para ello, desarrollaron la variante Br512. Esta proteína se generó mediante la fusión de Bst-LF con un dominio tipo *headpiece* (Hp47) derivado de villina de *Gallus gallus*. Esta modificación mejora la solubilidad, la termotolerancia y el plegamiento al estar fusionada en el extremo N-terminal, preservando la actividad de desplazamiento de hebra y favoreciendo la formación eficiente de estructuras tipo *hairpin* durante la amplificación LAMP. Asimismo, reportaron un incremento en el rendimiento de la purificación (35 mg/L) en comparación con la enzima nativa (10 mg/L).

En una línea similar, se han empleado técnicas de mutagénesis dirigida y diseño racional (Sinha & Shukla, 2019). Li et al. (2023) describieron variantes de Bst-LF con mutaciones específicas y fusiones con dominios de unión al ADN (*DNA Binding Domain*, DBD) ligasa de *Pyrococcus abyssi*, que aumenta la afinidad por el ADN, orientadas a incrementar la actividad catalítica y la tolerancia a inhibidores, logrando un desempeño analítico comparable al de versiones comerciales, como la Bst 2.0.

No obstante, la implementación sostenida de técnicas isotérmicas (LAMP o RPA) enfrenta barreras económicas debido al elevado costo por reacción (Dueñas et al., 2026;

Cunningham et al., 2021). En un trabajo relacionado, concluimos que la producción *in house* de reactivos críticos y la optimización de flujos de trabajo integrados al sistema de salud son alternativas costo-efectivas para la implementación de la prueba LAMP-CRISPR (Dueñas et al., 2026). Bajo este mismo enfoque, San Pedro et al. (2025) propusieron un método de producción simplificado que sustituye inductores costosos, como el IPTG, por leche entera en polvo (1% w/v) y reemplaza la lisozima por clara de huevo cruda (10% v/v) en la lisis celular. Mediante una purificación de un solo paso por afinidad (Ni-NTA), estandarizaron un ensayo RT-LAMP con una concentración enzimática de 9.0 ng/µL, manteniendo la estabilidad funcional en solución líquida con una composición de buffer de almacenamiento al 50% de glicerol a −80 °C durante 10 meses. En concordancia con estos hallazgos, la Bst-LF nativa producida en este trabajo conservó su actividad funcional en solución de almacenamiento y a −80 °C por aproximadamente un año, mostrando una disminución gradual de la eficiencia hacia el final del periodo sin llegar a la inactivación total.

Para potenciar esta estabilidad y facilitar la transferencia de esta técnica hacia escenarios de PoC, la liofilización de los componentes enzimáticos se presenta como una estrategia prometedora. Esta alternativa no solo mejora la conservación a largo plazo frente a fluctuaciones de temperatura y pH, sino que permite el despliegue de pruebas PoC en campo sin la dependencia de la cadena de frío (Nguyen et al., 2022).

Cabe señalar que la producción local de enzimas recombinantes para LAMP y/o CRISPR a gran escala requiere de un análisis sostenido de validación analítica entre lotes, control de calidad y cumplimiento regulatorio para garantizar un desempeño consistente en aplicaciones diagnósticas *in vitro* (Dueñas et al., 2026).

6.2 Optimización del ensayo LAMP

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la versatilidad de LAMP como una herramienta de detección molecular. Esta tecnología ha sido ampliamente evaluada en distintas manifestaciones de leishmaniasis, incluyendo las formas cutáneas, viscerales y dérmicas post-kala-azar (PKDL), demostrando ser una alternativa viable costo-efectiva para el diagnóstico molecular en entornos con recursos limitados (Soares et al., 2024;

Samsami et al., 2023; Hagos et al., 2021; Peeling & McNerney, 2014). Al ser una técnica de amplificación isotérmica, LAMP reduce la dependencia de equipamiento especializado y permite adaptarse a diversos formatos de lectura (*read-out*), desde métodos de punto final como la electroforesis en gel de agarosa (Khan et al., 2012), hasta la turbidimetría o el uso de colorantes fluorescentes (Samsami et al., 2023; Dixit et al., 2021).

No obstante, el desempeño de los ensayos LAMP es sensible a variables experimentales críticas, como el diseño de cebadores, el tiempo de incubación, la concentración del cofactor en la reacción (p. ej., Mg^{2+}) y la variabilidad en la actividad enzimática. Estos factores condicionan la cinética de amplificación y el límite de detección (LoD), lo que resalta la necesidad de una optimización rigurosa para garantizar la reproducibilidad en condiciones de laboratorio y de campo (Rolando et al., 2020).

Como parte de los objetivos del presente trabajo, se optimizaron distintos parámetros de la reacción LAMP, incluyendo la concentración de $MgSO_4$, el tiempo de incubación y la concentración enzimática. Para mitigar el riesgo de contaminación por aerosoles (uno de los principales desafíos de LAMP), se implementó una barrera física con aceite de inmersión. Esta estrategia limitó la dispersión de amplicones sin interferir con el desempeño de la reacción y evitó el uso de sistemas basados en la incorporación de dUTP en combinación con la enzima uracil-DNA glicosilasa (UDG), las cuales, si bien previenen la contaminación por productos de amplificación previos, pueden retrasar la cinética de amplificación y comprometer la sensibilidad analítica del ensayo (Zhang et al., 2024). Asimismo, se prescindió de aditivos como tetramethylammonium chloride (TMAC) o DMSO, utilizados habitualmente para reducir amplificaciones inespecíficas, pero que pueden interferir con la robustez del ensayo (Jang & Kim, 2022).

En el contexto de la detección de patógenos, se han descrito diferentes estrategias para visualizar los productos de amplificación generados por LAMP, incluyendo la observación mediante transiluminación UV para *Leishmania* spp. (Sukphattanaudomchoke et al., 2020) y el uso de indicadores fluorescentes como la calceína en otros microorganismos (Zhang et al., 2021). Sin embargo, varios de estos sistemas de lectura se basan en señales indirectas del proceso de amplificación, como los

cambios asociados a la formación del precipitado de pirofosfato de magnesio ($Mg_2P_2O_7$). En consecuencia, la señal generada refleja la amplificación global del ADN, por ejemplo, en la formación de dímeros de cebadores (Rolando et al., 2020), lo que puede incrementar el riesgo de resultados falsos positivos derivados de amplificaciones inespecíficas (Mori et al., 2001).

En respuesta a estas limitaciones de especificidad, se han desarrollado estrategias de detección dirigidas a la secuencia diana, como el uso de sondas marcadas (Ruang-Areerate et al., 2022; Phillips et al., 2018). En este contexto, la integración del sistema CRISPR-Cas12a representa un avance significativo, ya que añade una etapa de reconocimiento molecular programable que garantiza que la señal generada corresponda exclusivamente a la secuencia objetivo (Kaminski et al., 2021).

6.3 Desempeño analítico del ensayo LAMP-CRISPR para la detección de *Leishmania* spp.

La optimización de la prueba LAMP-CRISPR permite completar el diagnóstico en 1.5 a 2 h, dependiendo del marcador molecular utilizado. La versatilidad del ensayo permite la detección de resultados mediante fluorescencia (compatible con equipamiento básico de biología molecular, como un transiluminador de luz azul) o mediante lectura visual en tiras de flujo lateral (LFA), facilitando su portabilidad en distintos escenarios.

Los ensayos analíticos LAMP–CRISPR dirigidos a los marcadores kDNA y 18S rDNA alcanzaron límites de detección de 0.05 e.g.p./reacción (equivalente al 0.01 e.g.p/µL de ADN), lo cual es de relevancia para su aplicación clínica. Esta sensibilidad es comparable a lo reportado por técnicas moleculares de referencia como qPCR dirigidas al gen 18S, donde se obtuvieron límites de detección de 0.1 e.g.p./reacción para *L. (V.) panamensis* (Rosales-Chilama et al. 2020). Asimismo, estos resultados se alinean con lo descrito por Nzelu et al. (2016), quienes sitúan la sensibilidad analítica de FTA-LAMP (Flinders Technology Associates (FTA) acoplado con LAMP) en un rango de 0.1 a 0.01 parásitos/µL. Estos niveles de detección pueden variar dependiendo de la diana, el tipo de muestra y las condiciones del ensayo.

Estudios como el de Khan et al. (2018) y el de Foo et al. (2020) confirman que LAMP puede igualar o superar la sensibilidad analítica de la PCR convencional en distintos contextos diagnósticos. Específicamente para *Leishmania* spp., un estudio predecesor reportó una sensibilidad analítica de 5 e.g.p./reacción dirigida al marcador 18S mediante un enfoque PCR–CRISPR (Dueñas et al.,2022). Esta diferencia se atribuye principalmente a la amplificación isotérmica continua de LAMP, en la que la actividad de desplazamiento de hebra de la polimerasa Bst-LF permite una mayor acumulación de productos de amplificación por unidad de tiempo en comparación con PCR (Dangerfield et al., 2022).

Los hallazgos reportados en el presente estudio concuerdan con investigaciones que han evaluado el uso de múltiples dianas para la detección de *Leishmania* spp. Adams et al. (2018) reportaron un límite de detección entre 0.01 y 0.001 e.g.p./µL para kDNA y 18S utilizando colorantes fluorescentes inespecíficos, mientras que Ghosh et al. (2022) informaron un límite de detección analítico de 1 fg de ADN (equivalente a ~ 0.1 parásitos por reacción) para *L. donovani*, empleando el sistema Loopamp™ LF-160 incubator (Eiken Chemical Co., Japón), que permite amplificar los dos marcadores en simultáneo y también con lecturas de fluoróforo no específico. Estos estudios subrayan que el abordaje de múltiples dianas incrementa la robustez diagnóstica en muestras con baja carga parasitaria.

Por otro lado, la alta eficiencia se atribuye en parte al mecanismo isotérmico de LAMP y a la alta procesividad de la polimerasa Bst-LF, potenciada por un diseño de múltiples cebadores que reconocen diversas regiones de la secuencia diana, lo que contribuye a su vez a mejorar la especificidad del método (Notomi et al., 2000; Mori & Notomi, 2009).

En cuanto a la especificidad, el análisis *in silico* y la validación analítica confirmaron la capacidad de detección pan-*Leishmania* del marcador 18S rDNA, mientras que el marcador kDNA demostró una detección consistente de especies del subgénero *L.* (*Viannia*), predominantes en el Nuevo Mundo. Aunque los cebadores para kDNA se diseñaron flanqueando bloques conservados de los minicírculos (CSB) para favorecer la discriminación a nivel de subgénero (Yurchenko et al., 2000), se observó

detección en cepas del subgénero *L.* (*Leishmania*), en particular con *L. (L.) donovani* WR-2801 y *L. (L.) mexicana* BEL21. Este hallazgo podría explicarse por la presencia de motivos conservados entre distintas especies del género *Leishmania*, así como por la diversidad de clases de minicírculos presentes en el kDNA, que puede incluir variantes con alta similitud en la región diana utilizada para la amplificación (Kocher et al., 2018). Además, la alta sensibilidad de LAMP y su relativa tolerancia a apareamientos erróneos (*mismatches*) entre los cebadores y el ADN molde (Tamanaha et al., 2022), asociadas al uso de múltiples cebadores y a la amplificación isotérmica, podrían facilitar la amplificación de secuencias parcialmente complementarias.

La integración de la tecnología CRISPR-Cas12a mitiga estas limitaciones de especificidad. El análisis *in silico* demostró que la combinación de cebadores LAMP con el crRNA específico permite una discriminación precisa entre los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* y entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Este análisis permitió identificar tanto similitudes como variaciones en las secuencias de los minicírculos del kDNA mitocondrial (Figura S1, Anexo I) y del 18S rDNA (Figura S2, Anexo I).

Los ensayos LAMP–CRISPR dirigidos a kDNA y 18S exhibieron una alta especificidad al no presentar reactividad cruzada con otros patógenos que co-circulan en áreas endémicas y que podrían coinfectar al mismo hospedero humano, tales como *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* (este último también asociado a lesiones cutáneas que pueden simular LC) (Martínez et al., 2018) y diversas cepas de *Trypanosoma cruzi* (TcI (Sylvio X10), TcIV (VT-1) y TcVI (Tulahuen LacZ clon C4), un tripanosomátido filogenéticamente cercano a *Leishmania* spp.

Esto es particularmente relevante, dado que el marcador 18S rDNA es altamente conservado entre los tripanosomátidos, lo que históricamente ha dificultado la diferenciación entre *Leishmania* y *Trypanosoma* mediante LAMP convencional (Adams et al., 2010). En dicho estudio, se reportó que un ensayo LAMP basado en 18S rDNA no fue capaz de discriminar entre infecciones por *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. No obstante, debido a que las enfermedades causadas por estos patógenos presentan manifestaciones clínicas distintas, el diagnóstico diferencial puede

orientarse inicialmente a partir de los síntomas y confirmarse posteriormente mediante ensayos moleculares específicos (Adams et al., 2010).

Asimismo, en el presente estudio se observó que integrar la amplificación por LAMP con la detección posterior basada en CRISPR puede mejorar significativamente la discriminación entre resultados de amplificación positivos y negativos, además de incrementar la relación señal-ruido del ensayo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gutiérrez-Guarnizo et al. (2025), Sen et al. (2024) y Dueñas et al. (2026) y en conjunto evidencian la precisión analítica de la tecnología CRISPR.

6.4 Adaptación del sistema LAMP-CRISPR hacia un formato portátil

El desarrollo de este ensayo se alineó con los criterios ASSURED/REASSURED, los cuales definen las características ideales de las pruebas diagnósticas en entornos de recursos limitados tales como: que sean ensayos asequibles, sensibles, específicos, fáciles de usar, robustos y rápidos, libres de equipamiento complejo, con conectividad en tiempo real y aplicables a muestras de fácil recolección (Mabey et al., 2004; Land et al., 2019).

La incorporación de metodologías portátiles y de bajo costo es fundamental para el despliegue de herramientas moleculares en áreas endémicas. En este contexto, el uso de dispositivos de lectura simplificada, como las tiras de flujo lateral (LFA), los transiluminadores de luz azul o unidades móviles tipo maletín (p. ej., el dispositivo Bento Lab) (Kitamura et al., 2023), facilitan la implementación del diagnóstico en laboratorios con infraestructura mínima. Este enfoque ha demostrado su eficacia en la detección de diversas formas de leishmaniasis mediante tecnologías como la amplificación por polimerasa recombinasa (RPA), en estudios de campo realizados en Asia, mostrando un desempeño prometedor para el diagnóstico de VL, PKDL y LC (Gunaratna et al., 2018; Mondal et al., 2016; Ghosh et al., 2021).

La eficacia de la tecnología CRISPR-Cas12a acoplada a lecturas visuales ha sido validada recientemente en otros patógenos de importancia global. Por ejemplo, Low et al. (2023) demostraron una sensibilidad del 100% (89,3-100) y una especificidad del 98,6%

(94,7-100) en la detección del virus *monkeypox* (MPXV) utilizando LFA, con una concordancia del 96,8% respecto a las lecturas de fluorescencia.

En concordancia con estas tendencias, los resultados del presente estudio muestran una evolución significativa respecto a reportes previos. En un estudio piloto anterior, observamos discrepancias en la lectura LFA para el marcador 18S (72.2% de concordancia) en muestras con baja carga parasitaria (Dueñas et al., 2026). En la presente investigación, la optimización del flujo de trabajo permitió alcanzar una consistencia del 100% entre las lecturas por LFA y fluorescencia para ambos marcadores moleculares (kDNA y 18S), aunque este resultado está influenciado principalmente por el número muestral.

El formato portátil de LFA elimina la dependencia de fluorómetros y permite una interpretación binaria (positivo/negativo) clara y directa. La capacidad de obtener resultados consistentes en tiras de LFA valida la propuesta de este formato para el desarrollo de una plataforma diagnóstica de próxima generación basada en CRISPR, capaz de cerrar la brecha entre la alta sensibilidad en condiciones de laboratorio en centros de investigación centralizados y la necesidad de una respuesta rápida en el punto de atención (*point-of-care*).

6.5 Desempeño clínico de la prueba LAMP-CRISPR de muestras no invasivas

En el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), la ausencia de un único estándar de referencia, debido a la variabilidad en la presentación clínica y la carga parasitaria, hace imperativo el uso de técnicas moleculares de alta sensibilidad (Gomes et al., 2015; Kurizky et al., 2018). La implementación de estas herramientas permite mejorar la precisión diagnóstica y evitar tratamientos innecesarios con fármacos antileishmaniales de elevada toxicidad (Pinheiro et al., 2020).

En este contexto, Cruz et al. (2019) desarrollaron un *Target Product Profile* (TPP) para el diagnóstico PoC de leishmaniasis cutánea, reconociendo que, si bien las técnicas moleculares como la PCR ofrecen mayor sensibilidad, su complejidad técnica y costo restringen su aplicación rutinaria en áreas endémicas. El TPP plantea la necesidad de

alternativas más simples, priorizando el uso del hisopado de lesión (*lesion swab*) como muestra mínimamente invasiva, con testeo directo o mediante pasos mínimos de preparación, en entornos con recursos limitados.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el ensayo LAMP acoplado a CRISPR-Cas12a constituye una alternativa eficaz para la detección de *Leishmania* spp. en muestras no invasivas obtenidas en papel filtro. Se evaluó un panel de 17 muestras de lesiones (8 cutáneas, 5 mucosas y 4 controles endémicos), clasificadas mediante PCR convencional, provenientes de pacientes de las regiones de Cusco y Madre de Dios, Perú, donde predomina el subgénero *L.* (*Viannia*) (De los Santos et al., 2022). La extracción de ADN se realizó mediante el dispositivo S-TECH, un método simplificado que prescinde de kits comerciales y equipos costosos, en línea con las demandas del diagnóstico en entornos de recursos limitados (Barbiero et al., 2025; Van Henten et al., 2024; de Faria et al., 2022).

El muestreo invasivo, como aspirados con aguja fina, raspados o biopsias, sigue siendo frecuente en el diagnóstico de la LTA, tanto en su forma cutánea como en la mucocutánea, por su compatibilidad con métodos parasitológicos, moleculares e histopatológicos. En lesiones mucosas, este abordaje se considera especialmente relevante dado que la carga parasitaria suele ser baja, consecuencia de la intensa respuesta inflamatoria local (Boggild et al., 2011). Sin embargo, los métodos parasitológicos convencionales (microscopía directa, frotis y cultivo) presentan sensibilidad limitada, y los enfoques histopatológicos pueden mostrar baja especificidad cuando se emplean de forma aislada (Reithinger & Dujardin, 2008; Gomes et al., 2014; Kurizky et al., 2018).

Las diferencias en carga parasitaria entre los tipos de lesión también condicionan el desempeño diagnóstico. Estudios basados en qPCR han demostrado que las lesiones cutáneas pueden presentar cargas aproximadamente diez veces mayores que las mucosas, lo que favorece su detección molecular (Jara et al., 2013). Asimismo, un menor tiempo de evolución de la lesión (< 3 meses) se asocia con una mayor carga parasitaria (Jara et al., 2013). A esto se suma que el ADN parasitario puede persistir tras la resolución clínica, incluso después de tratamientos exitosos, lo que sugiere la presencia de parásitos residuales o material genético remanente en los tejidos (Martínez-Valencia et al., 2017).

En el presente trabajo, el desempeño comparativo de los marcadores: la kDNA-qPCR detectó 6 muestras que el ensayo LAMP-CRISPR no identificó; del mismo modo, 13 muestras no fueron detectadas con el marcador 18S. Esta disparidad se atribuye directamente a la diferencia en el número de copias genómicas: *Leishmania* spp. posee aproximadamente 10.000 copias de kDNA extracromosómico frente a las 10–170 copias de la región nuclear 18S rDNA por genoma (Leon et al., 1978; Inga et al., 1998).

Por su parte, los resultados negativos de ambas técnicas (qPCR y LAMP-CRISPR) fueron concordantes e incluyeron dos controles endémicos y una lesión mucosa curada. Estas muestras no mostraron valores de Cq ni temperatura de *melting* asociada (Tm). Mientras que las otras muestras que fueron detectadas, pero no cuantificables (BLOQ) presentaron valores de Cq tardíos (Cq ≥ 32) y correspondieron a lesiones curadas con tiempos de evolución de entre uno y cinco meses, rango compatible con la evolución clínica descrita para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Piscopo & Azzopardi, 2007).

Los hallazgos son consistentes con los de nuestro estudio relacionado, en el que reportamos una sensibilidad del 90.9% (IC 95%: 80.1–97.0%) para el marcador kDNA y del 72.7% (IC 95%: 59.0–83.9%) para 18S, con una especificidad del 100% (IC 95%: 90–100%) para ambos marcadores, donde se empleó un enfoque similar con kits comerciales tanto para la amplificación por LAMP como para la extracción de ADN a partir de lesiones cutáneas por *Leishmania* spp. En dicho estudio se observó que las discordancias se concentraron en muestras con Cq tardíos, donde la carga de ADN parasitario era baja (Dueñas et al., 2026).

El análisis de concordancia en el presente estudio entre el ensayo LAMP-CRISPR y la qPCR dirigida al marcador kDNA mostró un Acuerdo Positivo Porcentual (PPA) de 57.1% (IC 95%: 28.9–82.3%) y un Acuerdo Negativo Porcentual (NPA) de 100% (IC 95%: 29.2–100%). El PPA moderado se explica principalmente por la baja carga parasitaria en muestras de lesiones mucosas curadas, que fueron clasificadas como negativas por LAMP-CRISPR. En contraste, la ausencia de falsos positivos y la detección efectiva de todos los casos clínicos activos refuerzan la especificidad diagnóstica del

sistema propuesto. No obstante, los amplios intervalos de confianza reflejan la incertidumbre estadística asociada al tamaño muestral limitado. Por tanto, estos resultados constituyen una evaluación preliminar del desempeño diagnóstico que establece las bases para futuras validaciones con cohortes de mayor tamaño, orientadas a consolidar la robustez clínica del ensayo LAMP-CRISPR.

6.6 Evaluación del potencial diagnóstico clínico del flujo de trabajo propuesto para la detección molecular de *Leishmania* spp.

En los últimos años se han explorado de forma sostenida, diversas estrategias de muestreo no invasivas o mínimamente invasivas para el diagnóstico de leishmaniasis, incluyendo el uso de discos de cinta adhesiva (Taslimi et al., 2017; Van Henten et al., 2024), hisopados (Adams et al., 2014; Blaizot et al., 2021; da Faria et al., 2021) y papel filtro (Miranda et al., 2012), así como alternativas menos invasivas como microbiopsias y el uso de limas dentales (Van Henten et al., 2024). Estos enfoques han sido evaluados principalmente tomando como referencia pruebas como microscopía y PCR. En conjunto, los estudios muestran diferencias claras en el desempeño diagnóstico (sensibilidad y especificidad) entre los distintos tipos de muestra y también frente a métodos de muestreo más tradicionales en lesiones cutáneas como biopsias o raspados.

Estudios recientes, como el de Blaizot et al. (2021), han validado la eficacia de combinar muestras no invasivas, como el hisopado, con técnicas moleculares de alta sensibilidad, reportando valores de sensibilidad del 98% al emplear PCR en tiempo real dirigida al gen *Hsp70* de detección pan-*Leishmania* en hisopados, en muestras con valores de Cq tardíos (valor de Cq promedio de 31.4). Este alto desempeño sugiere que ciertos métodos superficiales de muestreo pueden recuperar una proporción mayor de ADN parasitario con relación al ADN humano (Taslimi et al., 2017). Lo anterior se atribuye a que los amastigotes no se distribuyen de forma homogénea en la lesión, concentrándose frecuentemente en las capas más superficiales de la dermis (Suárez et al., 2015). Además, la sensibilidad intrínseca de la técnica y la diana genética seleccionada también influyen en el desempeño diagnóstico observado (Blaizot et al., 2021).

Un punto importante para tener en cuenta es que la transición hacia métodos de toma de muestra menos invasivos puede comprometer la especificidad diagnóstica si no se establecen puntos de corte (*cut-off*) de Cq específicos para cada estrategia de toma de muestra. Esto lo observaron Van Henten et al. (2024). En dicho estudio evaluaron 344 pacientes evaluadas por qPCR dirigido al marcador kDNA, demostraron sensibilidades elevadas (96.1% para discos adhesivos, 89.0% para lima dental y 74.8% para microbiopsia), pero con una especificidad significativamente reducida y variable (entre 27.4% y 72.7%), debido a la amplificación tardía de trazas no específicas.

Esto limitó la comparación directa y sugirió un mayor riesgo de resultados falsos positivos con respecto a la prueba de referencia (qPCR) utilizando muestras extraídas por escisión superficial fina (*skin slit)*, demostrando variabilidad en los resultados según el tipo de toma de muestra y la necesidad de aplicar un Cq con *cut-off* ajustado frente a un Estándar de Referencia Compuesto (CRS) establecidos para cada prueba a evaluar (Van Henten et al., 2024; Taslimi et al., 2017).

Como alternativa económica y no invasiva, Valencia et al. (2012) evaluaron el cepillo citológico para la toma de muestra, obteniendo una sensibilidad del 99.1% y especificidad del 100% mediante PCR dirigido al marcador kDNA, superando tanto a la toma de muestra con lanceta (96.6% sensibilidad y 100% especificidad) como al frotis convencional teñido con Giemsa (47.9% sensibilidad y 82.3% especificidad). Estos hallazgos refuerzan la viabilidad de los métodos de toma de muestra simplificados que, al integrarse con métodos de detección robustos como LAMP-CRISPR, podrían mejorar la brecha diagnóstica en zonas endémicas.

La robustez de la polimerasa Bst-LF, empleada en LAMP, confiere una mayor tolerancia a inhibidores presentes en matrices biológicas (sangre, tejidos o medios de cultivo) en comparación con la Taq polimerasa utilizada en PCR convencional, permitiéndole amplificar en presencia de remanentes del proceso de extracción y de compuestos que habitualmente inhiben la PCR (Francois et al., 2011; Kaneko et al., 2007; Nwe et al., 2024). Esta característica permite, en ciertos contextos, omitir la purificación exhaustiva del ADN, facilitando flujos de trabajo más simples y portátiles, como se ha descrito en el diagnóstico de otros patógenos, incluido SARS-CoV-2 (Wei et al., 2021;

Marino et al., 2022). En el contexto específico de leishmaniasis cutánea, Taslimi et al. (2023) reportaron una sensibilidad del 97% y especificidad del 100% mediante discos adhesivos con el marcador kDNA para la detección de *Leishmania tropica* en muestras cutáneas, evidenciando el potencial de LAMP para integrarse con estrategias de muestreo no invasivo. No obstante, la simplificación extrema del pretratamiento puede comprometer el desempeño diagnóstico.

En cuanto a la calidad del ADN extraído, una adecuada toma de muestra es determinante para obtener resultados diagnósticos confiables mediante técnicas moleculares (Taslimi et al., 2017; Al-Jawabreh et al., 2018). Si bien el uso de kits comerciales es ampliamente utilizado, diversos estudios han evaluado estrategias de extracción "cruda" de ácidos nucleicos para optimizar flujos de bajo costo y mayor portabilidad. Procesos como el *Direct Boil* (DB), mediante inmersión en solución de lisis y calentamiento a ~100 °C sin purificación, han mostrado reducción de la sensibilidad atribuible a la presencia de inhibidores, contaminación con sangre o componentes tisulares (Imai et al., 2017; Mikita et al., 2014).

En leishmaniasis, De Faria et al. (2021) determinaron que hisopados procesados mediante DB y RT-LAMP dirigidos a 18S rDNA reducen la sensibilidad al 59.7% (especificidad 100%), frente al 82.5% y 86% obtenidos con kit comercial en hisopados y biopsias, respectivamente. De manera similar, Ghosh et al. (2022) reportaron una disminución en la sensibilidad de LAMP al emplear el método *Boil-Spin* (57.89%) frente al uso de kits (72.37%) en muestras de PKDL, desempeño significativamente menor que el registrado con análisis de qPCR en muestras extraídas con kits comerciales (> 90%) en estudios previos como el de Ghosh et al. (2018) y Jara et al. (2013).

Estas discrepancias se atribuyen a la heterogeneidad en la distribución de la carga parasitaria dentro de las lesiones, al procedimiento de toma de muestra que puede limitar la obtención de material a la epidermis, omitiendo zonas dérmicas de mayor densidad parasitaria, al marcador molecular utilizado y a la cronicidad de las lesiones, que puede comprometer tanto la visualización microscópica como la detección molecular (Suárez et al., 2015; Thomaz et al., 2021). En conjunto, estos hallazgos subrayan que, si bien LAMP es robusto frente a inhibidores, la calidad del ADN y la eliminación mínima de

remanentes de lisis siguen siendo determinantes para evitar la inhibición enzimática, especialmente al acoplar sistemas de detección adicionales como CRISPR-Cas. Asimismo, se destaca la necesidad crítica de estandarizar los protocolos de toma de muestra para reducir la variabilidad diagnóstica.

Para mitigar este sesgo, en el presente estudio se seleccionaron lesiones de tipo no crónico (evolución < 12 meses). La toma de muestra de impronta cutánea se realizó por duplicado en la misma localización anatómica y de forma simultánea, con el fin de minimizar la variabilidad entre los ensayos evaluados para una misma muestra. Cabe señalar que la distribución heterogénea de los parásitos en la lesión ulcerada impide homogeneizar la carga parasitaria recuperada; por ello, la cuantificación de la carga parasitaria (equivalentes genómicos de parásito por microgramo de ADN tisular (e.g.p./µg)) mediante qPCR permite normalizar los valores obtenidos. Así se puede comparar el desempeño de la prueba LAMP-CRISPR según la carga parasitaria de las muestras.

6.7 Perspectivas y limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio es el tamaño muestral (n = 17). Esto se debe principalmente a las barreras logísticas y administrativas asociadas a la obtención de muestras clínicas desde hospitales regionales, donde el manejo de muestras suele estar restringido a instituciones estatales. Asimismo, la población afectada por leishmaniasis suele desplazarse desde sus localidades solo para el diagnóstico, lo que dificulta el seguimiento clínico longitudinal. Esta realidad subraya la necesidad urgente de tecnologías descentralizadas que acerquen el diagnóstico molecular a las zonas de origen de los pacientes.

En este sentido, la portabilidad de las pruebas de detección molecular y el mantenimiento de la cadena de frío son factores críticos en las aproximaciones futuras de técnicas de diagnóstico que buscan una implementación en campo o para su uso en vigilancia epidemiológica.

Tanto las reacciones LAMP como las de CRISPR son compatibles con la liofilización (secado por congelación), un proceso que incrementa la estabilidad de los reactivos para su transporte y almacenamiento a temperatura ambiente y permite la preparación de mezclas pre-dosificadas (Nguyen et al., 2022). Esta mejora logística no solo mitiga la degradación enzimática, sino que reduce significativamente el riesgo de contaminación cruzada, facilita la configuración de los ensayos en formatos de kits prediseñados y simplifica el flujo de trabajo en campo. También, en entornos con infraestructura de cadena de frío limitada.

En relación con el análisis económico, en nuestro estudio previo (Dueñas et al., 2026) estimamos costos de las diferentes pruebas moleculares, con 13.4 dólares americanos (USD) para la lectura por LFA y 11.2 USD por fluorescencia por muestra analizada. Estas cifras muestran una disminución del costo aproximado frente a los 18.3 USD de la qPCR de kDNA empleando kits comerciales de extracción de ácidos nucleicos (Roche) y master mix de LAMP (NEB). En dicho esquema, el costo de las enzimas comerciales representó el componente principal (3.2 USD por reacción). En la presente investigación, al integrar insumos de producción propia (*in house*) y prescindir de kits comerciales, se logró una reducción adicional de aproximadamente 2 USD por muestra en ambos formatos de lectura.

Si bien el dispositivo S-TECH (https://www.dnaitech.com/s-tech) presenta actualmente un costo de 600 USD por 32 extracciones, es importante destacar que se encuentra en estos momentos en estado de prototipo. Se prevé que una producción a gran escala y adquisiciones al por mayor reducirían significativamente su costo unitario, fortaleciendo la viabilidad económica del flujo de trabajo propuesto con una disminución sustancial de la estimación de los costos.

La implementación de estos ensayos en entornos de campo conlleva el reto de garantizar la competencia técnica del personal en contextos de alta rotación. Los programas de formación deben trascender los procedimientos rutinarios e integrar competencias en control de calidad y resolución de problemas (*troubleshooting*) para asegurar un desempeño confiable (Campbell et al., 2021). No obstante, estas demandas de capacitación podrían mitigarse sustancialmente si la preparación de la reacción y la

lectura de la señal se integraran en un solo dispositivo de uso simplificado (Qian et al., 2024).

Aunque el sistema presentado en este estudio requiere fases adicionales de simplificación y validación extensiva, su potencial como herramienta de diagnóstico portátil en regiones endémicas es evidente. Su despliegue permitiría reducir los tiempos de respuesta asociados a los laboratorios centralizados y fortalecería la vigilancia epidemiológica en tiempo real.

La evolución hacia sistemas *one-pot* (reacciones en un solo compartimento) y la convergencia con plataformas *Lab-on-chip* tales como la plataforma diagnóstica integrada PLACID (LAMP-CRISPR en papel) representan el futuro del diagnóstico *in situ*, permitiendo la lectura mediante dispositivos móviles y eliminando la manipulación de fluidos (Sen et al., 2024).

Así, estas mejoras representan consideraciones importantes para el desarrollo futuro. De hecho, el formato actual de ensayo abierto en dos etapas LAMP-CRISPR conlleva un riesgo inherente de contaminación cruzada durante la transferencia de los productos amplificados desde el tubo de reacción (LAMP) hacia la placa de detección. Esta limitación, documentada previamente en otros sistemas isotérmicos (Nguyen et al., 2022), representa un área crítica de mejora para futuras versiones del ensayo que integren ambas reacciones en un solo compartimento cerrado (*one-pot*).

En resumen, este trabajo contribuye a la optimización de la técnica LAMP–CRISPR para la detección de *Leishmania* spp., estableciendo las bases para un flujo de trabajo portátil y adaptable en áreas endémicas. La integración de estrategias de colección y preparación de muestras más accesibles, mediante métodos no invasivos y el uso del dispositivo S-TECH, garantiza una mayor seguridad para el paciente y una reducción en las barreras logísticas del diagnóstico molecular.

En conjunto, LAMP–CRISPR no solo se perfila como una alternativa viable para el diagnóstico en PoC, sino también como una herramienta con potencial estratégico para la vigilancia epidemiológica descentralizada. Además, la implementación de formatos de

lectura como LFA permite la transferencia efectiva de tecnología hacia entornos con infraestructura limitada, facilitando su interpretación visual inmediata sin requerir instrumentación compleja.

Finalmente, la flexibilidad de estos ensayos en términos de selección de dianas, del diseño de cebadores y de secuencias de ARN guía (crRNA) permite su rápida adaptación a la variabilidad genómica de las cepas circulantes en regiones geográficas específicas. Esta capacidad de personalización, sumada al potencial costo-efectividad, posiciona a LAMP-CRISPR como una futura solución específica y escalable para los sistemas de salud de países de ingresos bajos y medianos.

VII. CONCLUSIONES

- La enzima Bst-LF producida localmente mostró un desempeño comparable al de la enzima comercial Bst 2.0, permitió optimizar el ensayo LAMP acoplado con CRISPR–Cas12a y respaldó el uso de enzimas producidas *in house* para la detección de *Leishmania* spp.

- Los ensayos LAMP–CRISPR mostraron una sensibilidad analítica de 0.05 e.g.p./reacción para ambos marcadores evaluados, kDNA y 18S rDNA, logrando detectar concentraciones bajas, lo cual fundamenta su relevancia clínica.

- Se confirmó una elevada especificidad analítica, sin reactividad cruzada frente a ADN humano ni a patógenos relevantes. Los marcadores evaluados aportaron información complementaria: mientras que kDNA logra discriminar principalmente a nivel del subgénero *L.* (*Viannia*), el marcador 18S rDNA permitió una detección pan-*Leishmania*.

- Se logró evidenciar una correspondencia absoluta entre lecturas por fluorescencia y tiras de flujo lateral (LFA), en la evaluación de muestras clínicas, demostrando la capacidad de la técnica LAMP-CRISPR para adaptarse a un formato portátil con resultados óptimos.

- En la evaluación del panel de muestras clínicas, el ensayo LAMP–CRISPR dirigido al marcador kDNA mostró alta concordancia con la prueba de referencia qPCR en la detección de muestras asociadas a infecciones activas y no se observaron resultados falsos positivos para ninguno de los marcadores evaluados.

- En conjunto, el ensayo LAMP-CRISPR basado en kDNA presentó un porcentaje de PPA de 57.1% y un NPA de 100%. Estos valores reflejan una concordancia moderada con la prueba de referencia, explicada por la naturaleza de las muestras de baja carga parasitaria (lesiones curadas). No obstante, la ausencia de falsos positivos y la detección efectiva de infecciones activas confirman el potencial del sistema como futura herramienta diagnóstica específica y oportuna en entornos descentralizados para la detección de *Leishmania* spp.

VIII. RECOMENDACIONES

- Debido a la elevada eficiencia de amplificación de LAMP y el consecuente riesgo de contaminación por aerosoles, se recomienda mantener una separación física rigurosa entre las áreas de trabajo (pre- y post-amplificación), el uso de material de laboratorio exclusivo para cada zona y la desinfección periódica de superficies con soluciones degradantes de ADN, como hipoclorito de sodio (lejía) al 0.5%, u otros agentes destinados a eliminar productos de amplificación. Asimismo, se sugiere explorar en futuras fases el desarrollo de formatos *one-pot* (reacción en un solo tubo) o el uso de colorantes que permitan la lectura sin apertura del vial, con el fin de minimizar la exposición de los amplicones al entorno.

- Se recomienda ampliar la validación diagnóstica mediante un estudio comparativo que incluya no solo la qPCR, sino también métodos convencionales de rutina como la microscopía directa y el cultivo parasitológico. Esto permitirá determinar la ganancia en sensibilidad del sistema LAMP-CRISPR frente al estándar actual de los servicios de salud, facilitando su integración como prueba diagnóstica dirigida a cepas de *Leishmania* spp. circulantes en la región.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, E. R., Schoone, G. J., Ageed, A. F., El Safi, S., & Schallig, H. (2010). Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *82*(4), 591–596.

Adams, E. R., Gomez, M. A., Scheske, L., Rios, R., Marquez, R., Cossio, A., & Saravia, N. G. (2014). Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology*, *141*(14), 1891-1897.

Adams, E. R., Schoone, G., Versteeg, I., Gomez, M. A., Diro, E., Mori, Y., Perlee, D., Downing, T., Saravia, N., Assaye, A., Hailu, A., Albertini, A., Ndung'u, J. M., & Schallig, H. (2018). Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Journal Of Clinical Microbiology*, *56*(7). https://doi.org/10.1128/jcm.00386-18

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 and Infections*, *8*(1), 1361–1369. https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1664939/SUPPL_FILE/TEMI_A_1664939_SM9205.ZIP

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

Alcántara, R., Peñaranda, K., Mendoza-Rojas, G., Nakamoto, J. A., Dueñas, E., Alvarez, D., Adaui, V., & Milón, P. (2021). UnCovid: A versatile, low-cost, and open-source protocol for SARS-CoV-2 RNA detection. *Star Protocols*, *2*(4). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100878

Al-Dhubaibi, M. S., Bahaj, S. S., Noman, A., Alkasser, W. Y., AbdElneam, A. I., Mohammed, G. F., ... & Ali, S. S. (2024). High specificity of PCR in diagnosing mucocutaneous leshminiasis: a systematic review and meta analysis. *BMC Infectious Diseases*, *24*(1), 1476.

Almassian, D. R., Cockrell, L. M. ., & Nelson, W. M. (2013). Portable nucleic acid thermocyclers. *Chemical Society Reviews*, *42*(22), 8769–8798.

Alvar, J., Velez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & The WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One*, *7*(5).

Aoun, K., & Bouratbine, A. (2014). Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, *21*. https://doi.org/10.1051/PARASITE/2014014

Arevalo, J., Ramirez, L., Adaui, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.,

& Llanos-Cuentas, A. A. (2007). Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal Of Infectious Diseases*, *195*(12), 1846-1851. https://doi.org/10.1086/518041

Ashford, R. W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*, *30*(12-13), 1269-1281.

Barbiero, A., Aiello, A., Ciccone, N., Pollini, S., Malentacchi, F., Colao, M. G., Rossolini, G. M., Fiorelli, C., Massi, D., Antonelli, A., Cuffari, S., Di Muccio, T., Bartoloni, A., Spinicci, M., & Zammarchi, L. (2025). Molecular Assays on Cutaneous Swabs as an Effective, Non-Invasive Diagnostic Technique for Cutaneous Leishmaniasis: Results from a Retrospective Study Conducted in Italy. *Tropical Medicine And Infectious Disease*, *10*(6), 158. https://doi.org/10.3390/tropicalmed10060158

Beckert, B., & Masquida, B. (2010). Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. *Methods in Molecular Biology*, *703*, 29–41.

Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(4), 1435–1439. https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006/FORMAT/EPUB

Boggild, A. K., Veland, N., Miranda-Verastegui, C., Ramos, A. P., Valencia, B. M., Llanos-Cuentas, A., Low, D. E., Arevalo, J., Espinosa, D., & Boggild, A. K. (2010). Clinical and Demographic Stratification of Test Performance: A Pooled Analysis of Five Laboratory Diagnostic Methods for American Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *83*(2), 345–350. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0414

Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, A., Uberti-Foppa, C., & Cinque, P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(11), 5080–5084.

Braga Filgueira, C. P., Cruz Moreira, O., Motta Cantanhêde, L., Teixeira de Farias, H. M., Britto, C., Porrozzi, R., Côrtes Boité, M., & Cupolillo, E. (2020). Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*.

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*, 870–874. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4

Bujang, M. A. (2023). An elaboration on sample size planning for performing a one-sample sensitivity and specificity analysis by basing on calculations on a specified 95% confidence interval width. *Diagnostics*, *13*(8), 1390.

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet* , *393*(10174), 872–873.

Campbell, S., Anderson, N., Babady, E., Durant, T. J. S., Fisher, A., & Moore, N. (2020). Centralized vs Decentralized Molecular Infectious Disease Testing. *Clinical Chemistry*, *67*(5), 713-719. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa318

Carvalho, A. M., Amorim, C. F., Barbosa, J. L. S., Lago, A. S., & Carvalho, E. M. (2015). Age Modifies the Immunologic Response and Clinical Presentation of American Tegumentary Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, *92*(6), 1173–1177. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0631

Cao, D., Hu, L., Lin, M., Li, M., Ye, Z., Sun, H., ... & Tian, J. (2015). Real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and reliable diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of microbiological methods*, *109*, 74-78.

Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., & Oliveira, F. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. *Communications biology*, *5*(1), 305.

Chargui, N., Bastien, P., Kallel, K., Haouas, N., Messaidi Akrout, F., Masmoudi, A., Zili, J., Chaker, E., Dhahri Ben Othman, A., Azaiez, R., Crobu, L., Mezhoud, H., & Babba, H. (2005). Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia . *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *99*(10), 762–768.

Chen, J. S., Enbo, M., Harrington, L., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, *360*(6387), 436–439. https://doi.org/10.1126/science.aar6245.

Chowdhury, R., Ghosh, P., Khan, M. A. A., Hossain, F., Faisal, K., Nath, R., Baker, J., Wahed, A. A. E., Maruf, S., Nath, P., Ghosh, D., Masud-Ur-Rashid, M., Rashid, M. U. B., Duthie, M. S., & Mondal, D. (2020). Evaluation of Rapid Extraction Methods Coupled with a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Point-of-Need Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Tropical Medicine And Infectious Disease*, *5*(2), 95. https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020095

Clopper, C. J., & Pearson, E. S. (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*, *26*(4), 404-413.

Córdova, N. M., Zurita, J., Guzmán, M., Verduguez, A., & Rojas, E. (2020). Differential patterns between leishmaniasis and chagas disease using Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Gaceta Médica Boliviana*, *43*(2), 120–126.

Cossio, A., Gore, N., Jojoa, J., Melby, P. C., TraviI, B. L., del Mar, M., Castillo, R. M., Osorio, L., & SheliteI, T. R. (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).

Cossíos, D. (2010). Vertebrados naturalizados en el Perú: historia y estado del conocimiento. *Revista Peruana de Biología*, *17*(2), 179–189.

Costa, J., Marsden, P., Llanos-Cuentas, E., Netto, E., Carvalho, E., Barral, A., Rosa, A.,

Cuba, C., Magalhães, A., & Barreto, A. (1986). Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *89*(6), 319–323.

Cruz, I., Albertini, A., Barbeitas, M., Arana, B., Picado, A., Ruiz-Postigo, J. A., & Ndung'u, J. M. (2019). Target Product Profile for a point-of-care diagnostic test for dermal leishmaniases. *Parasite epidemiology and control*, *5*, e00103.

Cruz, I., Millet, A., Carrillo, E., Chenik, M., Salotra, P., Verma, S., Veland, N., Jara, M., Adaui, 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.

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

Damry, A. M., & Jackson, C. J. (2021). The evolution and engineering of enzyme activity through tuning conformational landscapes. *Protein Engineering, Design and Selection*, *34*, gzab009.

Dangerfield, T. L., Paik, I., Bhadra, S., Johnson, K. A., & Ellington, A. D. (2022). Kinetics of elementary steps in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) show that strand invasion during initiation is rate-limiting. *Nucleic Acids Research*, *51*(1), 488-499. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1221

De Faria, V. C. S., Gonçalves, D. U., Soares, A. R. C., Barbosa, P. H., Saliba, J. W., De Souza, C. S. A., Cota, G. F., & De Avelar, D. M. (2021). Impact assessment of different DNA extraction methods for non-invasive molecular diagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Acta Tropica*, *227*, 106275. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106275

De los Santos, M. B., Ramírez, I. M., Rodríguez, J. E., Beerli, P., & Valdivia, H. O. (2022). Genetic diversity and population structure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the Peruvian jungle. *PLoS Negl Trop Dis*, *16*(5).

Dineva, M. A., Mahilum-Tapay, L., & Lee, H. (2007). Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. *The Analyst*, *132*(12), 1193. https://doi.org/10.1039/b705672a

Ding, X., Yin, K., Li, Z., Lalla, R. V., Ballesteros, E., Sfeir, M. M., & Liu, C. (2020). Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay. *Nature Communications*, *11*(1), 4711. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18575-6

Disch, J., Junqueira Pedras, M., 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.

Dixit, K. K., Verma, S., Singh, O. P., Singh, D., Singh, A. P., Gupta, R., Negi, N. S., Das, P., Sundar, S., Singh, R., & Salotra, P. (2018). Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(11), e0006922. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006922

Dueñas, E., Nakamoto, J. A., Cabrera-Sosa, L., Huaihua, P., Cruz, M., Arévalo, J., Milón, P., & Adaui, V. (2022). Novel CRISPR-based detection of *Leishmania* species. *Frontiers in Microbiology*, *2828*.

Dueñas, E., Tirado, I., Huaihua, P., Del Riego, A. P., Cabrera-Sosa, L., Nakamoto, J. A., Cruz, M., Restrepo, C. M., Arévalo, J., & Adaui, V. (2026). LAMP-coupled CRISPR-Cas12a assays: A promising new tool for molecular diagnosis of leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *20*(2), e0013456. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0013456

Fernández-Soto, P., Gandasegui Arahuetes, J., Sánchez Hernández, A., López Abán, J., Vicente Santiago, B., & Muro, A. (2014). A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of Schistosoma mansoni in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *8*(9).

Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *62*(1), 41-48. https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2011.00785.x

Foo, P. C., Najian, A. B. N., Muhamad, N. A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean, C. Y., & Lim, B. H. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on Entamoeba histolytica DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnology*, *20*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s12896-020-00629-8

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors Volume*, *11*(273).

García, A. L., Kindt, A., Quispe-Tintay, K. W., Bermudez, H., Llanos, A., Arevalo, J., Bañuls, A. L., De Doncker, S., Le Ray, D., & Dujardin, J. C. (2005). American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infection, Genetics and Evolution*, *5*(2), 109–116.

Ghosh, P., Chowdhury, R., Maruf, S., Picado, A., Hossain, F., Owen, S. I., Nath, R., Baker, J., Hasnain, M. G., Shomik, M. S., Ghosh, D., Rashid, M., Rashid, M. U., Sagar, S. K., Rahat, M. A., Basher, A., Nath, P., Edwards, T., Andrews, J. R., Mondal, D. (2022). Gauging the skin resident *Leishmania* parasites through a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Scientific Reports*, *12*(1), 18069. https://doi.org/10.1038/s41598-022-21497-6

Ghosh, P., Hasnain, M. G., Hossain, F., Khan, M. A. A., Chowdhury, R., Faisal, K., Mural, M. A., Baker, J., Nath, R., Ghosh, D., Maruf, S., Shomik, M. S., Haque, R., Matlashewski, G., Hamano, S., Duthie, M. S., & Mondal, D. (2018). Evaluation of Real-time PCR for Diagnosis of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis in Endemic Foci of Bangladesh. *Open Forum Infectious Diseases*, *5*(10), ofy234. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy23

Ghosh, P., Sharma, A., Bhattarai, N. R., Abhishek, K., Nisansala, T., Kumar, A., Böhlken-Fascher, S., Chowdhury, R., Khan, M. A. A., Faisal, K., Hossain, F., Uddin, M. R., Rashid, M. U., Maruf, S., Rai, K., Sooriyaarachchi, M., Abhayarathna, W. L. K., Karki, P., Kumar, S., . . . Wahed, A. A. E. (2021). A Multi-Country, Single-Blinded, Phase 2 Study to Evaluate a Point-of-Need System for Rapid Detection of Leishmaniasis and Its Implementation in Endemic Settings. *Microorganisms*, *9*(3), 588. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030588

Gomes, C. M., de Paula, N. A., Cesetti, M. V., Roselino, A. M., & Sampaio, R. N. R. (2014). Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a L. (V.) braziliensis–endemic area. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(4), 413–418.

Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science*, *360*(6387), 439–444. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAQ0179/SUPPL_FILE/AAQ0179_GOOTENBERG_SM.PDF

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*, *356*(6336), 438–442. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM9321/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF

Gow, I., Smith, N. C., Stark, D., & Ellis, J. (2022). Laboratory diagnostics for human *Leishmania* infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 412.

Gutiérrez-Guarnizo SA, Condori BJ, Basma L, Equilia S, Malaga E, Defazio S, Arteaga E, Velarde JK, Obregón M, Takyar A, Duque C, Hakim J, Tinajeros F, Gilman RH, Bowman N, Mugnier MR. A specific, stable, and accessible LAMP assay targeting the HSP70 gene of *Trypanosoma cruzi*. Microbiol Spectr. 2025 Nov 4;13(11):e0017225. doi: 10.1128/spectrum.00172-25. Epub 2025 Oct 14. PMID: 41085330; PMCID: PMC12584694.

Gunaratna, G., Manamperi, A., Böhlken-Fascher, S., Wickremasinge, R., Gunawardena, K., Yapa, B., Pathirana, N., Pathirana, H., De Silva, N., Sooriyaarachchi, M., Deerasinghe, T., Mondal, D., Ranasinghe, S., & Wahed, A. A. E. (2018). Evaluation of rapid extraction and isothermal amplification techniques for the detection of *Leishmania donovani* DNA from skin lesions of suspected cases at the point of need in Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 665. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3238-1

Hagos, D. G., Kiros, Y. K., Abdulkader, M., Arefaine, Z. G., Nigus, E., Schallig, H. H., & Wolday, D. (2021). Utility of the loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of visceral leishmaniasis from blood samples in Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *105*(4), 1050.

Hedman, J., Lavander, M., Salomonsson, E. N., Jinnerot, T., Boiso, L., Magnusson, B., & Rådström, P. (2018). Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics. *Accreditation and Quality Assurance*, *23*(3), 133-144.

Honigberg, B. M. (1963). A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. En J. Ludvík, J. Lom, & J. Vávra (Eds.), *Progress in Protozoology: Proceedings of the First International Congress on Protozoology* (pp. 33–38). Academic Press.

Huang, X., Tang, G., Ismail, N., & Wang, X. (2022). Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva. *EBioMedicine*, *75*.

Ibarra-Meneses, A. V., Corbeil, A., Wagner, V., Onwuchekwa, C., & Fernandez-Prada, C. (2022). Identification of asymptomatic *Leishmania* infections: a scoping review. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 5. https://doi.org/10.1186/s13071-021-05129-y

Imai, K., Tarumoto, N., Misawa, K., Runtuwene, L. R., Sakai, J., Hayashida, K., Eshita, Y., Maeda, R., Tuda, J., Murakami, T., Maesaki, S., Suzuki, Y., Yamagishi, J., & Maeda, T. (2017). A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 621. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2718-9

Inga, R., De Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., Le Ray, D., Arevalo, J., & Dujardin, J.-C. (1998). Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus Viannia. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *92*, 219–228.

Jang, M., & Kim, S. (2022). Inhibition of Non-specific Amplification in Loop-Mediated Isothermal Amplification via Tetramethylammonium Chloride. *BioChip Journal*, *16*(3), 326-333. https://doi.org/10.1007/s13206-022-00070-3

Jara, M., Adaui, 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. https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13

Jirmanus, L., Glesby, M. J., Guimarães, L. H., Lago, E., Rosa, M. E., Machado, P. R., & Carvalho, E. M. (2012). Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in an Area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Transmission Over a 20-Year Period. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, *86*(3), 426–433. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0378

Kaminski, M. M., Abudayyeh, O.O. Gootenberg, J. ., Zhang, F., & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, *5*, 643–656. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7v

Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., & Suzutani, T. (2006). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods*, *70*(3), 499-501. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008

Kariyawasam, R., Valencia, B. M., Lau, R., Shao, E., Thompson, C. A., Stevens, M., Castillo, L. K., Del Quispe, A. L., 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*, 1203–1211. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s15010-021-01673-y.

Khan, M., Wang, R., Li, B., Liu, P., Weng, Q., & Chen, Q. (2018). Comparative Evaluation of the LAMP Assay and PCR-Based Assays for the Rapid Detection of Alternaria solani. *Frontiers In Microbiology*, *9*, 2089. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02089

Kitamura, K., Ueno, M. K., & Yoshida, H. (2023). Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices. *Microbiology Spectrum*, *11*(6), e0045623. https://doi.org/10.1128/spectrum.00456-23

Kocher, A., Valiere, S., Banuls, A. L. ., & Murienne, J. (2018). High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. . *Parasitology*, *145*(5), 585–594.

Kurizky, P. S., da Mota, L. M. H., & Gomes, C. M. (2018). The paradox of tegumentary leishmaniasis diagnosis: How the need for accurate and modern techniques is being addressed in low income areas. *EBioMedicine*, *38*, 19-20.

Lainson, R. ; S. J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution . In W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine.* (Vol. 1, pp. 1–120).

Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., & Peeling, R. W. (2019). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature microbiology*, *4*(1), 46-54.

Lee, R. A., De 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/SUPPL_FILE/PNAS.2010196117.SAPP.PDF

Lee, S., Nam, D., Park, J. S., Kim, S., Lee, E. S., Cha, B. S., & Park, K. S. (2022). Highly Efficient DNA Reporter for CRISPR/Cas12a-Based Specific and Sensitive Biosensor. *BioChip Journal*, *16*(4), 463-470. https://doi.org/10.1007/s13206-022-00081-0

Li, H., Xie, Y., Chen, F., Bai, H., Xiu, L., Zhou, X., ... & Yin, K. (2023). Amplification-

free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives. *Chemical Society Reviews*, *52*(1), 361-382.

Li, J., Li, Y., Li, Y., Ma, Y., Xu, W., & Wang, J. (2023). An enhanced activity and thermostability of chimeric Bst DNA polymerase for isothermal amplification applications. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *107*(21), 6527-6540. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12751-6

Llanes, A., Restrepo, C. M., Vecchio, G. Del, Anguizola, F. J., & Lleonart, R. (2015). The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the L. (Viannia) subgenus. *Scientific Reports*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep08550

Low, S. J., O'Neill, M. T., Kerry, W. J., Krysiak, M., Papadakis, G., Whitehead, L. W., Savic, I., Prestedge, J., Williams, L., Cooney, J. P., Tran, T., Lim, C. K., Caly, L., Towns, J. M., Bradshaw, C. S., Fairley, C., Chow, E. P. F., Chen, M. Y., Pellegrini, M., . . . Williamson, D. A. (2023). Rapid detection of monkeypox virus using a CRISPR-Cas12a mediated assay: a laboratory validation and evaluation study. *The Lancet Microbe*, *4*(10), e800-e810. https://doi.org/10.1016/s2666-5247(23)00148-9

Lucas, C. M., Franke, E. D., Cachay, M. I., Tejada, A., Cruz, M. E., Kreutzer, R. D., McCann, S. H. E., Watts, D. M., & Barker, D. C. (1998). GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND CLINICAL DESCRIPTION OF LEISHMANIASIS CASES IN PERÚ. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *59*(2), 312–317.

Lucchi, N. W., Demas, A., Narayanan, J., Sumari, D., Kabanywanyi, A., Kachur, S. P., Barnwell, J. W., & Udhayakumar, V. (2010). Real-Time Fluorescence Loop Mediated Isothermal Amplification for the Diagnosis of Malaria. *PLoS ONE*, *5*(10), e13733. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013733

Lukeš, 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/ASSET/5420650D-DFA9-46C0-99F1-18183AC7494A/ASSETS/GRAPHIC/EK0420038005.JPEG

Lukeš, J., Hashimi, H., & Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. . *Current Genetics*, *48*, 277-299.

Mabey, D., Peeling, R. W., Ustianowski, A., & Perkins, M. D. (2004). Diagnostics for the developing world. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(3), 231-240.

Marino, F. E., Proffitt, E., Joseph, E., & Manoharan, A. (2022). A rapid, specific, extraction-less, and cost-effective RT-LAMP test for the detection of SARS-CoV-2 in clinical specimens. *PLoS ONE*, *17*(4), e0266703. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266703

Martínez-Valencia, A. J., Daza-Rivera, C. F., Rosales-Chilama, M., Cossio, A., Rincón, E. J. C., Desai, M. M., Saravia, N. G., & Gómez, M. A. (2017). Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005713. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005713

Martins, A. L. G. P., Barreto, J. A., Lauris, J. R. P., & Martins, A. C. G. P. (2014). American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *Anais brasileiros de dermatologia*, *89*(1), 52-58.

Matute, T., Nuñez, I., Rivera, M., Reyes, J., Blázquez-Sánchez, P., Arce, A., Brown, A., Gandin, C., Molloy, J., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Federic, F. (2021). Homebrew reagents for low-cost RT-LAMP. *Journal of Biomolecular Techniques*, *32*(3), 114–120.

McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, *22*(3), 276–282. https://doi.org/10.11613/BM.2012.031.

Mendonça, M. G., de Brito, M. E. F., Rodrigues, E. H. G., Bandeira, V., Jardim, M. L., & Abath, F. G. C. (2004). Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(6), 1018–1023.

Milenia Biotec. (2020). CRISPR/Cas-based detection methods and HybriDetect: Universal test strips – individual readout.

Mikita, K., Maeda, T., Yoshikawa, S., Ono, T., Miyahira, Y., & Kawana, A. (2014). The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitology International*, *63*(6), 785-789. https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.007

MINSA. (2023a). Situación epidemiológica de la Leishmaniasis en el Perú. https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202212_22_181950_2.pdf

MINSA. (2023b). Vigilancia, prevención y control de Leishmaniasis. Centro Nacional de Epidemiologia, Prevencion y Control de Enfermedades. https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/subsistema-de-vigilancia/enfermedades-metaxenicas-o-arbovirosis/vigilancia-prevencion-y-control-de-leishmaniasis/

Miranda, A., Saldaña, A., González, K., Paz, H., Santamaría, G., Samudio, F., & Calzada, J. (2012). Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, *106*(9), 544-548. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.005

Mondal, D., Ghosh, P., Khan, M. A. A., Hossain, F., Böhlken-Fascher, S., Matlashewski, G., Kroeger, A., Olliaro, P., & Wahed, A. A. E. (2016). Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 281. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1572-8

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, *289*(1), 150-154.

Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnol. 2006 Jan 10;6:3.

Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, *15*(2), 62-69.

Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., Sabeti, P. C. (2018). Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, *360*(6387), 444–448. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAS8836/SUPPL_FILE/AAS8836-MYHRVOLD-SM.PDF

Nolder, D., Roncal, N., Davies, C. R., Llanos-Cuentas, A., & Miles, M. (2007). Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(3), 573–578.

Nguyen, L. T., Rananaware, S. R., Pizzano, B. L. M., Stone, B. T., & Jain, P. K. (2022). Clinical validation of engineered CRISPR/Cas12a for rapid SARS-CoV-2 detection. *Communications Medicine*, *2*(1), 7. https://doi.org/10.1038/s43856-021-00066-4

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, *28*(12), 63.

Nwe, M. K., Jangpromma, N., & Taemaitree, L. (2024). Evaluation of molecular inhibitors of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Scientific Reports*, *14*(1), 5916. https://doi.org/10.1038/s41598-024-55241-z

Nzelu, C. O., Cáceres, A. G., Guerrero-Quincho, S., Tineo-Villafuerte, E., Rodriquez-Delfin, L., Mimori, T., ... & Kato, H. (2016). A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta tropica*, *153*, 116-119.

Nzelu, C. O., Kato, H., & Peters, N. C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(11), e0007698. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.000769

Organización Panamericana de Salud. (2023). Leishmaniasis.

Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*, *18*(6), 407-421.

Pearson, R., & de Queiroz Sousa, A. (1996). Clinical Spectrum of Leishmaniasis . *Clinical Infectious Diseases*, *22*(1), 1–13. https://www.jstor.org/stable/4459156

Pedro, M. V. S., Cañas, V. A., Garcia, J. R., Lopez, C., Zulueta, M., & Macauyag, E. A. (2025). A low-cost production method for Bst DNA polymerase (large fragment). *SciEnggJ*, *18*(1), 20-27. https://doi.org/10.54645/2025181hvr-89

Peeling, R. W., & McNerney, R. (2014). Emerging technologies in point-of-care molecular diagnostics for resource-limited settings. *Expert review of molecular diagnostics*, *14*(5), 525-534.

Peres Martins, A. L. G., Barreto, J. A., Pereira Lauris, J. R., & Peres Martins, A. C. G. (2014). American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *89*, 52–58.

Pan American Health Organization. Leishmaniasis. Pan American Health Organization: PAHO. 2017. Available from: https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-leishmaniasis-factsheet-work.pdf

Preativatanyou, K., Songumpai, N., Khositharattanakool, P., Ampol, R., Promrangsee, C., Sricharoensuk, C., & Siriyasatien, P. (2024). Novel duplex TaqMan-based quantitative PCR for rapid and accurate diagnosis of *Leishmania (Mundinia)* martiniquensis and *Leishmania (Mundinia) orientalis*, responsible for autochthonous leishmaniasis in Thailand. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, *6*, 100217.

Phillips EA, Moehling TJ, Bhadra S, Ellington AD, Linnes JC. Strand Displacement Probes Combined with Isothermal Nucleic Acid Amplification for Instrument-Free Detection from Complex Samples. Anal Chem. 2018 Jun 5;90(11):6580-6586.

Piscopo, T. V., & Azzopardi, C. M. (2007). Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, *83*(976), 649-657. https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047340corr1

Qian, X., Xu, Q., Lyon, C. J., & Hu, T. Y. (2024). CRISPR for companion diagnostics in low-resource settings. *Lab on a Chip*, *24*(20), 4717-4740.

Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, *7*(9), 581–596.

Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(1), 21–25. https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06

Rivera, M., Cazaux, S., Cerda, A., Medina, A. A., Núñez, I., Matute, T., Brown, A., Gasulla, J., Federici, F., & Ramirez-Sarmiento, C. A. (2020). Recombinant protein expression and purification of codon-optimized Bst-LF polymerase.

Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. (2020). Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Research*, *48*(7), e42. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa099

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. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, *102*(6), 1323-1327. https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0691

Rossetti, M., Merlo, R., Bagheri, N., Moscone, D., Valenti, A., Saha, A., Arantes, P. R., Ippodrino, R., Ricci, F., Treglia, I., Delibato, E., Van Der Oost, J., Palermo, G., Perugino, G., & Porchetta, A. (2022). Enhancement of CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity using hairpin DNA reporters. *Nucleic Acids Research*, *50*(14), 8377-8391. https://doi.org/10.1093/nar/gkac578

Ruang-Areerate, T., Sukphattanaudomchoke, C., Thita, T., Leelayoova, S., Piyaraj, P., Mungthin, M. & Siripattanapipong, S. (2021). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay using SYBR safe and gold-nanoparticle probe for detection of *Leishmania* in HIV patients. *Scientific reports*, *11*(1), 12152.

Rugani, J. N., Quaresma, P. F., Gontijo, C. F., Soares, R. P., & Monte-Neto, R. L. (2018). Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *108*, 1170-1180.

Samsami, S., Namavari, S., Ataei, S., Ghasemian, A., Yazdanpanah, A., Sepahi, N., ... & Ghanbariasad, A. (2023). A Novel Multiplex LAMP Assay for the Rapid and Accurate Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* from Iran. *Journal of Tropical Medicine*, *2023*(1), 9326183.

Samir, W., Llalle, C., Cubas, W. S., Centeno-Leguía, D., Arteaga-Livias, K., & Depaz-López, E. (2018). Epidemiología. *Revista Chilena de Infectología*, *36*(6). www.revinf.cl

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. *Revista Peruana de Medicina Experimental de Salud Pública* , *37*(1).

Saravia, N. G., Segura, I., Labrada, L. A., Weigle, K., Giannini, S. H., Pacheco, R., & Goncalves, A. (1990). Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection—reactivation or reinfection? *The Lancet*, *336*(8712), 398–402.

Seminario, N. V., Palomino, F., Maita, R. B., Torres, E., Carrión, E., Díaz, D., Lucas, C., Escalante, I., Victorio, J., & Rivera, N. (1995). Leismaniasis Tegumentaria. *Folia Dermatológica Peruana*, *6*(2). https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/folia/vol6_n2/trabajos1.htm

Sen, A., Masetty, M., Weerakoon, S., Morris, C., Yadav, J. S., Apewokin, S., & Priye, A. (2024). based loop-mediated isothermal amplification and CRISPR integrated platform for on-site nucleic acid testing of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, *257*, 116292.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(1), 539. https://doi.org/10.1038/msb.2011.75

Sinha, R., & Shukla, P. (2019). Protein engineering for improved health: technological

perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, *20*(9), 856-860.

Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The structure and replicationof kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 117–143.

Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, *45*, 255–272.

Sima, N., Dujeancourt-Henry, A., Perlaza, B. L., Ungeheuer, M.-N., Rotureau, B., & Glover, L. (2022). SHERLOCK4HAT: A CRISPR-based tool kit for diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *The Lancet*, *85*.

Sleator, R. D. (2016). Synthetic biology: from mainstream to counterculture. *Arch Microbiol*, *3*, 711–713. https://doi.org/10.1007/s00203-016-1257-x

Soares, A. R. C., De Faria, V. C. S., & De Avelar, D. M. (2024). Development and accuracy evaluation of a new loop-mediated isothermal amplification assay targeting the HSP70 gene for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE*, *19*(8), e0306967. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306967

Sriworarat, C., Phumee, A., Mungthin, M., Leelayoova, S., & Siriyasatien, P. (2015). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1202-x

Suárez, M., Braulio M. Valencia, M. J., Alba, M., Boggild, A. K., Dujardin, J.-C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J., & Adaui, V. (2015). Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(7). https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003936

Sukphattanaudomchoke, C., Siripattanapipong, S., Thita, T., Leelayoova, S., Piyaraj, P., Mungthin, M., & Ruang-Areerate, T. (2020). Simplified closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for visual diagnosis of *Leishmania* infection. *Acta Tropica*, *212*, 105651.

Talmi-Frank, D., Nasereddin, A., Schnur, L. F., Schönian, G., Özensoy Töz, S., Jaffe, C. L., & Baneth, G. (2010). Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *4*(1).

Tamanaha, E., Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2022). Profiling RT-LAMP tolerance of sequence variation for SARS-CoV-2 RNA detection. *PLOS ONE*, *17*(3), e0259610. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259610

Taslimi, Y., Sadeghipour, P., Habibzadeh, S., Mashayekhi, V., Mortazavi, H., Müller, I., Lane, M. E., Kropf, P., & Rafati, S. (2017). A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005750. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005750

Thomaz, C., De Mello, C. X., De Melo Espíndola, O., De Oliveira Shubach, A., Quintella, L. P., De Oliveira, R. V. C., Duarte, A. C. G., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., & De Almeida Marzochi, M. C. (2021). Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE*, *16*(1),

e0243978. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243978

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, *3*(5), 877-882.

Valencia, B. M., Veland, N., Alba, M., Adaui, V., Arevalo, J., Low, D. E., Llanos-Cuentas, A., & Boggild, A. K. (2012). Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *PLoS ONE*, *7*(11), e49738. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049738

Van Henten, S., Kassa, M., Fikre, H., Melkamu, R., Mekonnen, T., Dessie, D., Mulaw, T., Bogale, T., Engidaw, A., Yeshanew, A., Cnops, L., Vogt, F., Moons, K. G. M., Van Griensven, J., & Pareyn, M. (2024). Evaluation of Less Invasive Sampling Tools for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Open Forum Infectious Diseases*, *11*(4), ofae113. https://doi.org/10.1093/ofid/ofae113.

Vashishtha, A. K., & Konigsberg, W. H. (2018). The effect of different divalent cations on the kinetics and fidelity of Bacillus stearothermophilus DNA polymerase. *AIMS biophysics*, *5*(2), 125.

Veland, N., Boggild, A. K., Valencia, C., Valencia, B. M., Llanos-Cuentas, A., Van der Auwera, G., Dujardin, J.-C., & Arevalo, J. (2012). *Leishmania (Viannia)* Species Identification on Clinical Samples from Cutaneous Leishmaniasis Patients in Peru: Assessment of a Molecular Stepwise Approach. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(2).

Vink, M. M., Nahzat, S. M., Rahimi, H., Buhler, C., Ahmadi, B. A., Nader, M., Zazai, F. R., Yousufzai, A. S., Van Loenen, M., Schallig, H. D., Picado, A., & Cruz, I. (2018). Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. *EBioMedicine*, *37*, 453-460. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.063

Wang, D.-G., Brewster, Jeffrey D. Moushumi, P., & Tomasula, P. M. (2015). Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Molecules*, *20*(4), 6048–6059. https://doi.org///doi.org/10.3390/molecules20046048

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25*(9), 1189-1191.

World Health Organization. Leishmaniasis. World Health Organization: WHO. 2023. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis

Wei, S., Kohl, E., Djandji, A., Morgan, S., Whittier, S., Mansukhani, M., Hod, E., D'Alton, M., Suh, Y., & Williams, Z. (2021). Direct diagnostic testing of SARS-CoV-2 without the need for prior RNA extraction. *Scientific Reports*, *11*(1), 2402. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81487-y

Weigle, K. A., Labrada, L. A., Lozano, C., Santrich, C., & Barker, D. C. (2002). PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by

Leishmania (Viannia). *Journal Of Clinical Microbiology*, *40*(2), 601-606. https://doi.org/10.1128/jcm.40.2.601-606.2002

Wilson, L., Fouts, D. L., & Manning, J. (1978). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Research*, *5*(2), 491–504.

Wu, Y., Tian, X., Song, N., Huang, M., Wu, Z., Li, S., & Yang, G. (2020). Application of quantitative PCR in the diagnosis and evaluating treatment efficacy of leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 581639.

Yao, C. (2020). *Leishmania* spp. and leishmaniasis on the Caribbean islands. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *114*(2), 73-78.

Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., & Lukeš, J. (2000). Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. *Folia Parasitologica*, *47*(1), 1-5. https://doi.org/10.14411/fp.2000.001

Zhang, M., Liu, J., Shen, Z., Liu, Y., Song, Y., Liang, Y., Li, Z., Nie, L., Fang, Y., & Zhao, Y. (2021). A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens. *BMC Microbiology*, *21*(1), 197. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02223-0

Zhang, C., Luo, Z., & Lin, X. (2024). One-pot dual-CRISPR/Cas12b-mediated dUTP-LAMP for rapid and sensitive detection of foodborne pathogens without carryover contamination. *Food Bioscience*, *59*, 104069. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104069

Zhou, X. H., Li, C. M., & Yang, Z. (2008). Improving interval estimation of binomial proportions. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *366*(1874), 2405-2418.

Zhou, J., Li, Z., Olajide, J. S., & Wang, G. (2024). CRISPR/Cas-based nucleic acid detection strategies: Trends and challenges. *Heliyon*, *10*(4), e26179. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26179

X. ANEXOS

Anexo I.

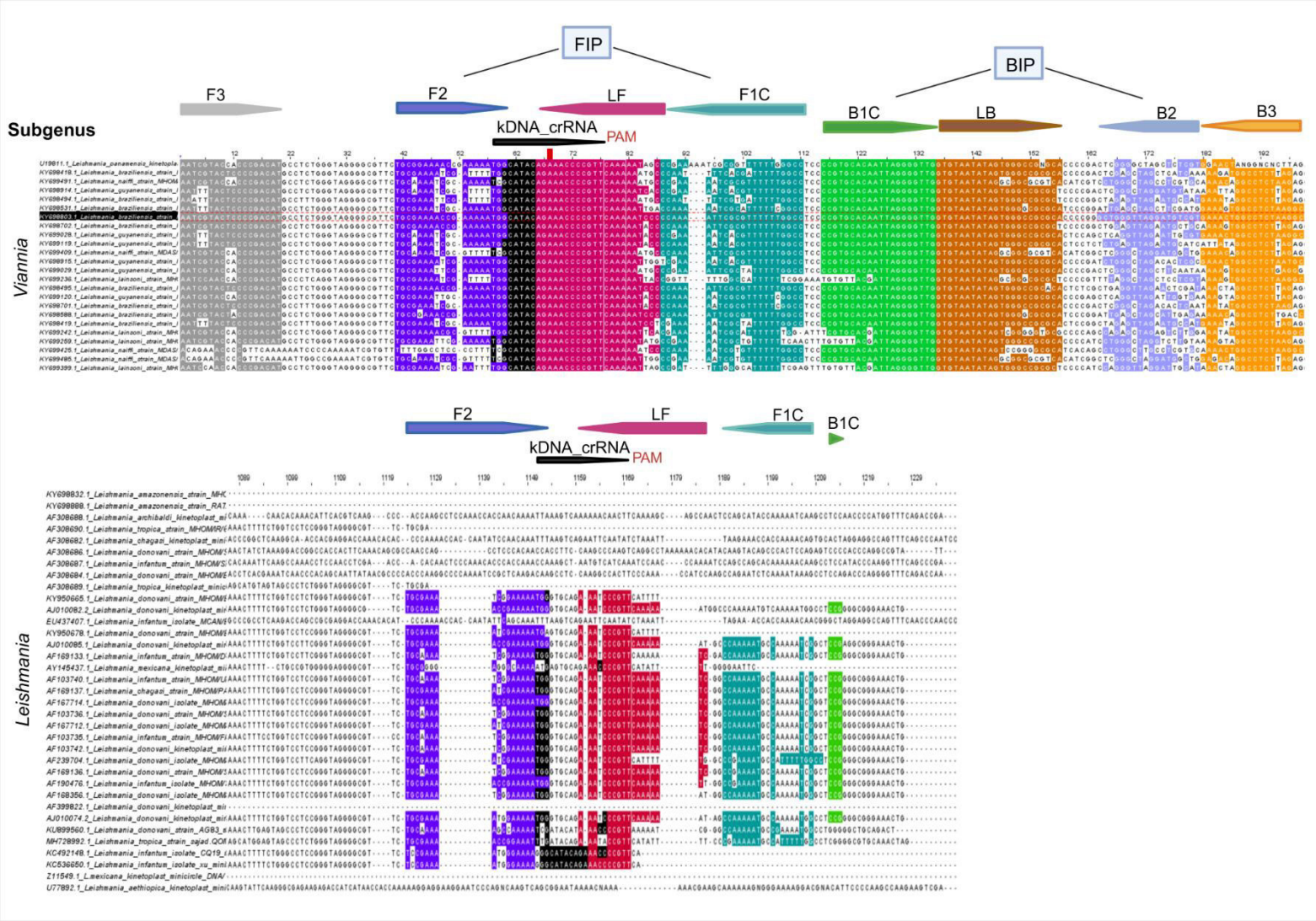


Figura S1. Alineamiento múltiple de secuencias representativas de minicículos de kDNA de miembros de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, con las regiones de unión de los cebadores LAMP y el sitio diana del crRNA resaltados.

Un total de 24 secuencias de *L. (Viannia)* y 35 de *L. (Leishmania)* fueron alineadas utilizando Clustal Omega (los alineamientos se realizaron por separado para cada subgénero) y visualizadas en Jalview v2.11.4.1. Las ubicaciones de las regiones de unión de los cebadores, así como del sitio diana del crRNA y la secuencia PAM en el ADN objetivo, están resaltadas con colores para indicar la conservación de la secuencia dentro del subgénero *L. (Viannia)* y la divergencia de la secuencia dentro del subgénero *L. (Leishmania)*. Las variantes nucleotídicas se representan mediante espacios en el alineamiento. La secuencia del minicículo de kDNA de la cepa *L. (V.) braziliensis* M2904 (número de acceso GenBank KY698803.1) presentó una identidad del 100 % en todas las regiones diana de los cebadores y del crRNA.

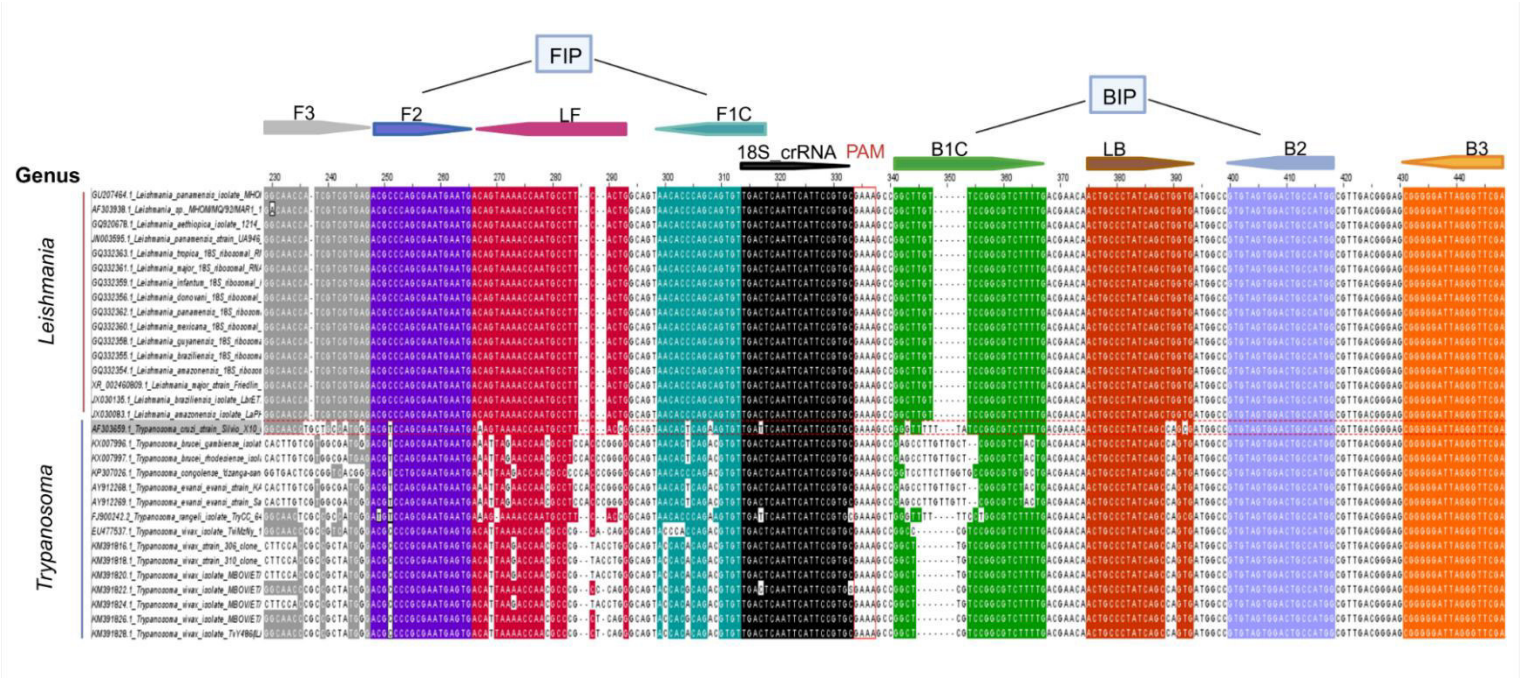


Figura S2. Alineamiento múltiple de secuencias representativas del 18S rDNA de miembros de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, con las regiones de unión de los cebadores LAMP y el sitio diana del crRNA resaltados.

Se alinearon un total de 31 secuencias (16 de *Leishmania* spp. y 15 de *Trypanosoma* spp.) usando Clustal Omega y se visualizaron en Jalview v2.11.4.1. Las regiones de unión de los cebadores, así como el sitio diana del crRNA y la secuencia PAM en el ADN objetivo, se

resaltan con colores para indicar la conservación de secuencia dentro del género *Leishmania* y las variaciones de secuencia dentro del género *Trypanosoma*. Las variantes nucleotídicas se representan mediante espacios en el alineamiento.

Anexo II

II.I Cálculo de la eficiencia de transformación de *E. coli* BLR(DE3)

700 UFC ……. 300 µl (Volumen sembrado)

X UFC totales ……. 500 µl (Volumen inicial)

$$\text{X UFC totales} = \frac{700\ \text{UFC x 500 µl}}{200\ \text{µl}} = 1167\ \text{UFC}$$

X UFC totales……1167 UFC

Bst_pTI µg de ADN …… 0.1 µg

$$\text{Eficiencia} = \frac{1167\ \text{UFC}}{0.1\ \text{µg}} = 11670\ \text{UFC/µg}$$

I.II Cálculo del porcentaje de transformación de *E. coli* BLR(DE3)

700 UFC ……. 300 µl (Volumen sembrado)

X UFC totales ……. 500 µl (Volumen inicial)

$$\text{X UFC totales} = \frac{700\ \text{UFC x 500 µl}}{300\ \text{µl}} = 1167\ \text{UFC}$$

Número total de células bacterianas de *E. coli* BLR(DE3) competentes

1200 UFC x 10^1 ... ... 50 µl (Volumen sembrado)

X UFC totales ……. 100 µl (Volumen inicial)

X UFC totales $= \frac{1200 \text{ UFC x } 10^1 \text{ x } 100\mu l}{50\ \mu l} = 2400 \text{ UFC x } 10^1$

2400 UFC x 10^1 …… 100% (pIT-Bst-LF)

1167 UFC (transformantes) …… x % (pIT-Bst-LF)

Porcentaje de transformantes $= \frac{1167 \text{ UFC x } 100\%}{2400 \text{ UFC x } 10^1} = 4.86\%$

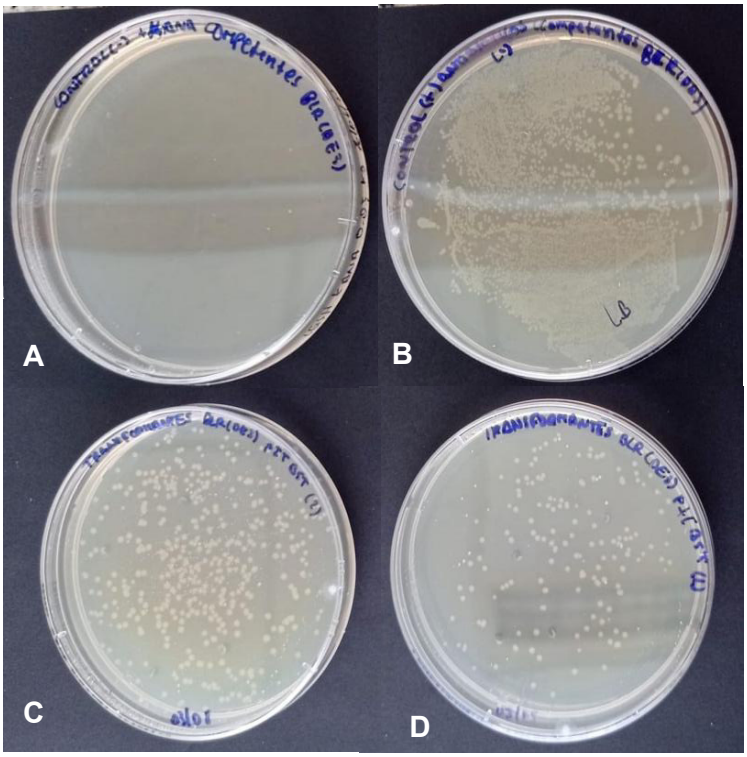


Figura S3. Resultados del ensayo de transformación del plásmido pTI-Bst-LF en cepas competentes de *E. coli* BLR(DE3). La placa A, control (-), cepas de BLR(DE3) sin el plásmido recombinante, en medio agar LB con kanamicina (0.05 mg/mL). La placa B, control (+), cepas competentes de BLR(DE3) en medio agar LB sin antibióticos.
En la placa C se sembró con 300 µl y D con 200 µl del mismo cultivo de cepas recombinantes de BLR(DE3) con el plásmido pTI-Bst-LF en medio de selección de agar LB con kanamicina (0.05 mg/mL).

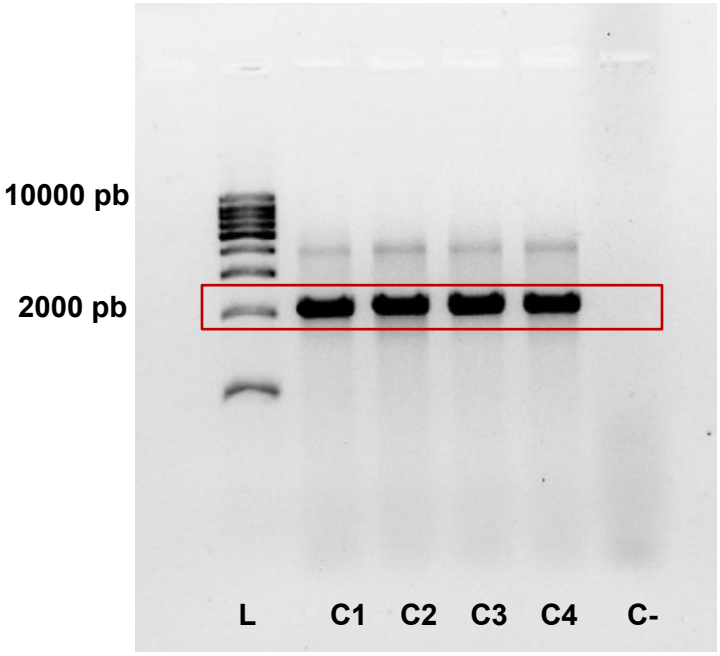


Figura S4. Gel de agarosa al 0.8% (L: Ladder 1 kb; C1, C2, C3, C4: clonas recombinantes; C-: control negativo de la reacción).

Se muestran los resultados de la PCR en clon para la identificación del promotor T7 en el plásmido recombinante pTI-Bst-LF, a partir de 4 clones obtenidos de la transformación en la cepa de *E. coli BLR(DE3)*. Los fragmentos obtenidos corresponden a la longitud de pb del promotor T7 incluido el fragmento del gen codificante de la Bst-LF (1978 pb).

El tamaño se determinó a partir del mapa del plásmido pTI-Bst-LF (https://benchling.com/s/seq-pUppz9KgipgkoUuRwvlq/edit#).

XI. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

Publicación de un artículo científico en la revista PLoS Neglected Tropical Diseases generada durante la ejecución de la Maestría en Biología Molecular.

Dueñas E, Tirado I, Huaihua P, Parra Del Riego A, Cabrera-Sosa L, Nakamoto JA, Cruz M, Restrepo CM, Arévalo J, Adaui V. LAMP-coupled CRISPR-Cas12a assays: A promising new tool for molecular diagnosis of leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2026 Feb 13;20(2):e0013456. doi: 10.1371/journal.pntd.0013456.