

C.Z.U.: 616.24-002.5-07-08

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2025.2-82.35>

TEHNOLOGIA CRISPR – DIAGNOSTIC INOVATIV PENTRU TUBERCULOZA MULTIDROG-REZISTENTĂ

Ecaterina CERNOV, ORCID: 0009-0000-2658-9448¹

Elena CHESOV, ORCID: 0000-0001-8942-2282^{1,2},

Stela RACOVITĂ, ORCID: 0000-0002-0900-0096^{1,2}

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

²Centrul de Medicină Personalizată, Laboratorul de genetică

email: elena.chesov@usmf.md

Rezumat.

Tuberculoza multidrog-rezistentă (TB-MDR) rămâne o provocare majoră de sănătate publică, cu aproximativ 400.000 de cazuri raportate global în 2023. Republica Moldova se numără printre țările cu cea mai mare incidență a TB-MDR din regiunea europeană. În acest context, aplicarea unei metode de diagnostic mai rapide, cu sensibilitate și specificitate mai superioare comparativ cu metodele existente de diagnostic al tuberculozei, cum ar fi cele bacteriologice sau cele moleculare, precum GeneXpert, care ar putea face posibilă detectarea *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) chiar și în probe modeste, sau în absența sputei, devine emergentă. Această lucrare sintetizează datele recente din literatura de specialitate referitoare la utilizarea CRISPR-Cas în diagnosticul tuberculozei (TB), cu accent pe acuratețea diagnostică, metodele de amplificare și potențialul aplicării în regiuni cu resurse limitate.

Tehnologia CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), oferă o nouă, precisă și eficientă abordare a diagnosticului rapid al TB-MDR, important în stabilirea precoce a diagnosticului și inițierea cât mai devreme a tratamentului potrivit – etape-cheie în prevenirea răspândirii globale a tuberculozei multidrog-rezistente. Acest articol explorează mecanismul de diagnostic CRISPR, avantajele acestuia și analiza comparativă cu metodele folosite la moment în diagnosticul tuberculozei (TB).

Cuvinte cheie: TB-MDR, diagnostic, CRISPR-Cas, mutații, *Mycobacterium tuberculosis*.

Summary. CRISPR technology – innovative diagnostics for multidrug-resistant tuberculosis.

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) remains a major public health challenge, with approximately 400,000 cases reported globally in 2023. The Republic of Moldova is among the countries with the highest incidence of MDR-TB in the European region. In this context, the application of a faster diagnostic method, with higher sensitivity and specificity compared to existing tuberculosis diagnostic techniques—such as bacteriological or molecular methods like GeneXpert—which could enable the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) even in modest samples or in the absence of sputum, becomes increasingly urgent.

This paper synthesizes recent data from the scientific literature regarding the use of CRISPR-Cas in tuberculosis (TB) diagnostics, with a focus on diagnostic accuracy, amplification methods, and its potential applicability in resource-limited settings.

The CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) technology offers a new, precise, and efficient approach to the rapid diagnosis of MDR-TB, which is crucial for early diagnosis and timely initiation of appropriate treatment—key steps in preventing the global spread of multidrug-resistant tuberculosis.

This article explores the CRISPR diagnostic mechanism, its advantages, and a comparative analysis with currently used tuberculosis (TB) diagnostic methods.

Keywords: MDR-TB, diagnosis, CRISPR-Cas, mutations, *Mycobacterium tuberculosis*.

Резюме. Технология CRISPR – инновационная диагностика множественно-устойчивого туберкулеза.

Туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) остаётся одной из серьёзных проблем общественного здравоохранения, с приблизительно 400 000 зарегистрированных случаев по всему миру в 2023 году. Республика Молдова входит в число стран с наивысшей заболеваемостью МЛУ-ТБ в Европейском регионе. В этом контексте особенно актуально внедрение более быстрой диагностической методики, обладающей большей чувствительностью и специфичностью по сравнению с существующими методами диагностики туберкулёза, такими как бактериологические или молекулярные методы, например GeneXpert, что позволит выявлять *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) даже в малых образцах или при отсутствии мокроты.

Настоящая работа обобщает последние данные научной литературы, касающиеся использования технологии CRISPR-Cas в диагностике туберкулёза (ТБ), с акцентом на точность диагностики, методы амплификации и потенциал применения в условиях с ограниченными ресурсами.

Tehnologia CRISPR (повторяющиеся палиндромные участки с регулярными интервалами, сгруппированные в кластеры) предлагает новый, точный и эффективный подход к быстрой диагностике МЛУ-ТБ, что имеет решающее значение для раннего установления диагноза и своевременного начала соответствующего лечения — ключевые этапы в предотвращении глобального распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

В статье рассматриваются диагностический механизм CRISPR, его преимущества и сравнительный анализ с существующими методами диагностики туберкулеза (ТБ).

Ключевые слова: МЛУ-ТБ, диагностика, CRISPR-Cas, мутации, *Mycobacterium tuberculosis*.

Introducere.

Tuberculoza continuă să reprezinte o problemă majoră în domeniul sănătății publice, necesitând metode de diagnostic rapide și fiabile [1]. Conform "Raportului Global privind Tuberculoza 2024", publicat de OMS, au fost depistate 10.8 milioane de cazuri noi de TB în anul 2023, dintre care 400.000 (3.7%) erau pacienți cu tuberculoză multidrog-rezistentă (TB-MDR) sau rifampicin-rezistentă (RR)[2]. Severitatea acestei maladii infecțioase și caracterul epidemic ce-l poartă este ilustrat prin mortalitatea înaltă la nivel mondial a 1.25 milioane de oameni în 2023, accentuând necesitatea unor mecanisme eficiente de control al bolii. Abordările de diagnostic convenționale, cum ar fi cultura, microscopia și GeneXpert, au contribuit în mod semnificativ la controlul TB, dar au și limite în ceea ce privește detectarea TB-MDR. Tehnologia CRISPR-Cas, recunoscută inițial pentru aplicațiile sale în editarea genomică, a fost recent adaptată în sisteme de diagnostic molecular datorită specificității secvențiale și capacității de a funcționa la temperaturi izoterme, făcând-o potrivită pentru utilizarea în teren [3, 4].

Scopul acestei lucrări este analiza datelor recente din literatura de specialitate referitoare la utilizarea CRISPR-Cas în diagnosticul tuberculozei, cu accent pe acuratețea diagnostică, și caracteristica comparativă cu metodele bacteriologice și moleculare convenționale de diagnostic.

Material și Metode.

Cercetarea a fost efectuată în baza analizei articolelor din PubMed. Pentru identificarea articolelor, au fost utilizați următorii termeni de căutare: "tuberculosis", "resistance", "diagnosis", "CRISPR". Au fost selectate studiile relevante publicate între 2020 și 2025.

Rezultate.

În urma unei analize sistematice a bazei de date PubMed, au fost identificate un număr total de 16.466 de articole publicate în ultimii cinci ani (2020–2025) care abordează metodele de diagnostic al tuberculozei. Dintre acestea, doar 39 de articole investighează utilizarea tehnologiilor bazate pe

platforme CRISPR ca metodă de diagnostic pentru *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Mai mult, din aceste 39 de studii, doar 16 articole includ date privind detecția rezistenței la medicamente a MTB, analizând aplicabilitatea platformelor CRISPR în contexte clinice.

Mecanismul de acțiune al sistemului CRISPR-Cas, identificat inițial ca parte a răspunsului imun adaptativ al procariotelor împotriva infecțiilor virale și a altor elemente genetice străine, este important în înțelegerea modului în care această tehnologie poate fi adaptată ca instrument de diagnostic molecular [5, 6]. Această adaptare permite detectarea specifică a unor mutații genetice, inclusiv a celor responsabile pentru rezistența la medicamente în cazul bacteriei *Mycobacterium tuberculosis*. Secvențele de ADN CRISPR sunt formate din numeroase regiuni repetitive scurte și sunt despărțite de către spaceri complementari ADN-ului bacteriofagilor sau altor sisteme genetice invadatoare. Din moment ce un material genetic străin atacă bacteria, sistemul CRISPR-Cas se adaptează, bacteriile preluând genele străine și înglobându-le în propriul genom. Astfel, la un următor contact cu organismul străin (un virus sau o plasmidă), din secvențele CRISPR, care conține spacerii ce recunosc ADN-ul străin, se vor transcrie un crARN (CRISPR ARN) și un tracrARN (ARN trans-activant). Aceste secvențe de ARN se vor lega complementar pentru a crea ARNg (ARN-ghid), la care se alătură proteina Cas, care va folosi ARNg, ca să identifice locul specific ce necesită tăiat [7]. Pentru clivaj este indispensabilă prezența unei secvențe amplasate imediat de regiunea-țintă, care este numită PAM (protospacer adjacent motif). Totuși, secvența de ARN care este complementară ADN-ului viral cunoscut este liberă, și la recunoașterea acestuia, proteina Cas, prin activitatea sa nucleazică, va cliva genele străine, ca și mecanism de apărare [3, 4, 7].

Acest mecanism, care există natural în bacterii, poate fi utilizat pentru detectarea secvențelor mutante din ADN-ul *Mycobacterium tuberculosis*, după aceleași principii.

Procesul de diagnostic prin sistemul CRISPR-Cas implică 3 etape: adaptare, clivaj și interferență [8]. În timpul primei faze, fragmentul de ADN străin

este inserat într-un locus CRISPR, astfel devenind un spacer, care, ulterior, va fi folosit ca o matriță pentru sinteza crARN. În faza a doua, se formează moleculele mici de ARN care conțin secvența complementară ARN a spacer-ului, deci are loc crearea crARN sau ARNg. În ultima fază, are loc recunoașterea ADN-ului țintă de către complexul CRISPR, cu ajutorul ARNg, și este clivat de Cas (Figura 1).

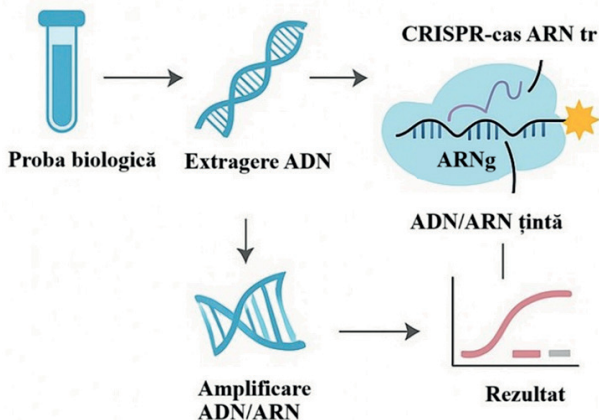


Figura 1. Etapele procesului de diagnostic prin platforma CRISPR-Cas

Este nevoie de două structuri: ARN-ul ghid unic (ARNsg), ce va recunoaște secvența-țintă în gena de interes, și endonucleaza Cas, care va cliva lanțul de ADN. Cas și ARNg pot forma un complex ribonucleoproteic eficient, care va depista și degrada ADN-ul țintă, având PAM adiacent acestuia [9].

Familia de endonucleaze Cas include: Cas9, poate fi utilizată pentru editare genică, țintește ADN dublu-catenar, necesită prezența PAM, și nu are activitate enzimatică colaterală; Cas12 – țintește ADN dublu-catenar, necesită PAM, are activitate colaterală, este utilizată în diagnosticul molecular, editarea ADN-ului, poate genera un semnal amplificat, datorită activității endonucleazice programabile și specifice; ADN-ul dublu-catenar poate fi obținut prin amplificare izotermă (LAMP); Cas13, ce țintește ARN-ul monocatenar, nu necesită PAM, dar totuși este nevoie de efectuarea transcripției in vitro pentru a pune la dispoziție ținta de ARN monocatenar, ceea ce este consumator de timp și costisitor financiar, și e util în depistarea virusurilor ARN; iar Cas14 – țintește ADN monocatenar, detectează fragmente foarte mici de ADN, cum ar fi SNP-urile (polimorfisme de un singur nucleotid), nu necesită PAM, are o greutate moleculară mai mică decât Cas12a, detaliu benefic și mai potrivit pentru expresia în *E.coli*, dar poate avea nevoie de PCR pentru amplificarea ADN-ului țintă, lucru ce este consumator de timp, și poate avea activitate colaterală [10–13].

În linii generale, prin CRISPR-Cas, rezistența MTB va fi detectată la utilizarea ARNg, una din

proteinele Cas, a cărei activitate va fi stimulată de prezența mutației căutate, iar clivajul va fi extins asupra unei probe fluorescente, generând un semnal detectabil, în cazul prezenței secvenței genetice țintă, care va confirma mutația și va indica medicilor despre posibilitatea sau imposibilitatea folosirii medicamentelor necesare [11, 15, 16].

Rezistența MTB la medicamente este condiționată de apariția unor mutații de tip SNP în genomul bacteriei, fapt ce o face insensibilă la anumite antibiotice folosite în tratamentul bolnavilor de TB. Pentru a putea folosi tehnica de diagnostic folosind CRISPR-Cas, este necesară cunoașterea exactă a mutațiilor care conduc la rezistență, pentru a decide care din ele vor fi potrivite pentru inițierea tratamentului și care trebuie evitate [10, 17].

Medicația antituberculoasă de primă linie este reprezentată de rifampicină, isoniazidă, pirazinamidă și etambutol; dacă MTB este rezistentă la rifampicină și isoniazidă, atunci o numim TB-MDR. Terapia modernă pentru TB-MDR include medicamente recent aprobate precum bedaquilina, delamanid, pretomanid și linezolid, care au revoluționat tratamentul formelor rezistente [18]. Cea mai de temut și rară variantă a rezistenței la antituberculoase, o prezintă, în final, multidrog rezistența extinsă (TB-XDR), atunci când MTB capătă rezistență atât la medicamentele de primă linie – rifampicină și isoniazidă, cât și la orice fluorochinolonă (ex. levofloxacină, moxifloxacină), și rezistență la cel puțin un medicament din grupa A, cum ar fi bedaquilina sau linezolid.

Rezistența la antibiotice se poate explica prin modificări la 4 nivele: alterarea permeabilității peretelui celular, funcției pompei de eflux, metabolismului celular și apariția de mutații genetice [19].

Este de mare utilitate să se cunoască unde anume au loc mutațiile, pentru a sintetiza sisteme CRISPR-Cas ce se vor potrivi secvențelor mutante, pentru confirmarea rezistenței [20–22].

Cel mai frecvent utilizate ezyme din familia Cas, în cadrul sistemelor CRISPR-Cas, în scopul depistării mutațiilor genetice ale MTB sunt: Cas9, Cas12, Cas13, Cas14. Aceste proteine fac parte din sisteme CRISPR-Cas de clasa 2, dintre care: Cas9 este clasificată drept tip II, Cas12 și Cas14 – tip V, Cas13 – tip VI (Figura 3). Toate aceste sisteme Cas dispun de caracteristici distincte, precum structuri diferite ale crARN, PAM-uri variate, anumite particularități de țintire și clivare. Fiecare se evidențiază prin utilitate specifică, cu avantaje și dezavantaje specifice [23, 24].

Cas efectuează două tipuri de clivare: cis și trans. Cis-clivarea înseamnă tăierea ADN-ului sau ARN-ului țintă, exact pe care îl "căuta", pe când trans-

clivarea (sau clivaj colateral/activitate colaterală) reprezintă activarea enzimei chiar și după tăierea secvenței-țintă, astfel încât clivează ADN-ul sau ARN-ul din jur.

CRISPR-Cas9

Cas9 recunoaște doar secvențe de ADN dublu-catenar, dar acestea nu efectuează activitate de trans-clivare, ci doar cis-clivare, deci utilitatea CRISPR-Cas9 se bazează numai pe proprietatea de a detecta țintit mutația căutată. Cas9 are două domenii active: RuvC, care va tăia doar un lanț de ADN, pe când al doilea domeniu – HNH – taie a doua catenă. Totuși, enzima Cas9, modificată genetic, există în două forme speciale – Cas9n (nickase), în care unul din cele două domenii active a fost dezactivat genetic, și dCas9 (dead Cas9) – care este inactivată complet, deci are proprietatea de a se lega de ADN, fiind ghidată de ARNg, dar nu-l clivează, ci îi blochează expresia genetică [25, 26].

În primul rând, diagnosticul prin CRISPR-Cas va necesita o tehnică de amplificare a secvenței de ADN țintă, de exemplu qRT-PCR. Așadar, se creează ARN-ghid pentru pozițiile S531 și H526 ale genei rpoB responsabilă de rezistența la rifampicină (RIF) a MTB; se va folosi proteina Cas9. Așa cum 97% dintre mutațiile rezistente la rifampicină sunt prezente în gena rpoB, iar 60-86% dintre acestea se află în codoanele 526 și 531, este argumentat de ce anume aceștia vor fi ținta sistemului CRISPR-Cas [9]. Totodată, prezența rezistenței la rifampicină (RIF) este utilizată ca un marker al prezenței rezistenței și la isoniazidă (INH), deoarece mai mult de 90% din tulpinile RIF-rezistente sunt și INH rezistente [9]. La contactul cu ADN-ul bacterian din proba biologică a pacientului, complexul Cas9/ARNg va cliva secvența de ADN de interes, ce conține un PAM adiacent, lucru depistat prin qRT-PCR, folosind proba marcată fluorescent. Localizarea mutației nu trebuie să fie nici prea aproape de PAM, fiindcă ar exista riscul unui semnal fluorescent prea slab, dar, totodată, la o amplasare mai departe de 20-25 de perechi baze (pb) de la PAM există posibilitatea de a genera un semnal apropiat celui care apare în absența mutației. Așadar, distanța optimă dintre PAM și mutație este de 10 baze azotate [26, 27]. De asemenea, este importantă localizarea mutației aproape de capătul 3' al secvenței-țintă a ARNg, acest fapt demonstrând o sensibilitate mai mare față de nepotrivirea de baze, în comparație cu situarea mutației la capătul 5' al secvenței-țintă, permițându-i sistemului CRISPR să funcționeze mai eficient în diferențierea dintre secvențele normale și mutante [27]. Metoda CRISPR-Cas se evidențiază printr-o înaltă sensibilitate și o specificitate de 100%.

Din studiile analizate, Cas9 nu a fost utilizat în niciunul dintre studiile de diagnostic clinic asupra *Mycobacterium tuberculosis* (TB sau TB-MDR). Majoritatea aplicațiilor Cas9 se regăsesc fie în studii preclinice sau fundamentale, cum ar fi CRISPRi/CRISPRa pentru identificarea de gene esențiale (ex: vulnerabilități colaterale în tulpini MDR), fie în editare genetică, dar nu sunt descrise în diagnosticul propriu-zis [9, 28].

CRISPR-Cas12a

Cas12a posedă activitate de cis-clivare, când se leagă la ADN dublu-catenar (Figura 2) sau monocatenar, complementar la crARN, dar poate avea activitate colaterală (trans-clivare) specifică pentru ADN monocatenar [29].

Enzima Cas12a poate fi sintetizată în bacterii *E.coli* specială, capabilă să o producă, dintr-o plasmidă introdusă în aceasta [7]. Cas12a (cunoscută anterior ca și Cpf1) poate fi folosită îndeosebi la depistarea rezistenței MTB la streptomycină, având în vedere faptul că aceasta recunoaște de regulă PAM-uri ce conțin timină, precum TTN/TTTN, ceea ce îi limitează aplicarea, dar care pot fi recunoscute de crARN programabil [7]. Astfel, sistemul CRISPR-Cas12a poate fi utilizat în detectarea în gena rpsL a mutațiilor Lys43Arg și Lys88Arg [12]. Pentru a testa eficiența sistemului, se amplifică secvențele ADN ce conțin mutațiile de interes din gena rpsL, se amplifică izotermic primerii potriviți. Încă un avantaj îl reprezintă faptul că sistemul CRISPR-Cas12a necesită la amplificarea RPA doar temperaturi de 37 sau 39°C, ceea ce îl face accesibil pentru utilizare în medii cu resurse limitate [23, 30, 31]. După aceasta, genele rpsL ale MTB sunt adăugate în sistemul de reacție cu Cas12a, iar, după 15 minute la 37 grade Celsius, prezența mutației este confirmată prin rezultatul fluorescent verde [12]. Rolul Cas12a, până la momentul actual, a fost expus prin mai multe aplicații, cum ar fi în DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter) – care a folosit, pentru prima dată, activitatea colaterală a Cas12, folosind RPA, a amplificat virusul HPV ; HOLMES (detecție de nivel subatomolar) folosind PCR sau RT-PCR sau LAMP, Cat-SMELOR (a moleculelor mici) [32, 11].

Un studiu a evaluat sensibilitatea sistemului, prin adăugarea acestuia la gene din diverși agenți patogeni, precum *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, pentru a verifica dacă sistemul reacționează doar la MTB, și nu la contactul cu alte bacterii. Astfel, doar la interferența cu probele în care erau prezente *Mycobacterium tuberculosis* și BCG au fost produse semnale fluorescente puternice, iar în celelalte cazuri

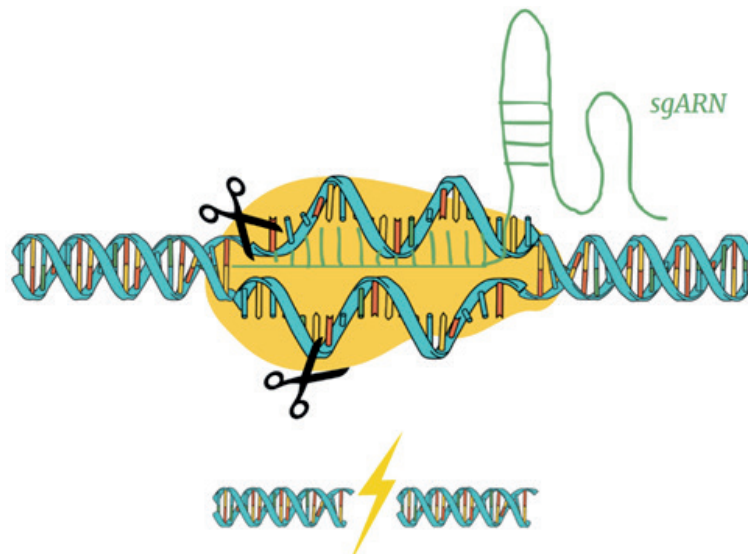


Figura 2. CRISPR-Cas12a clivează ADN-ul dublu-catenar

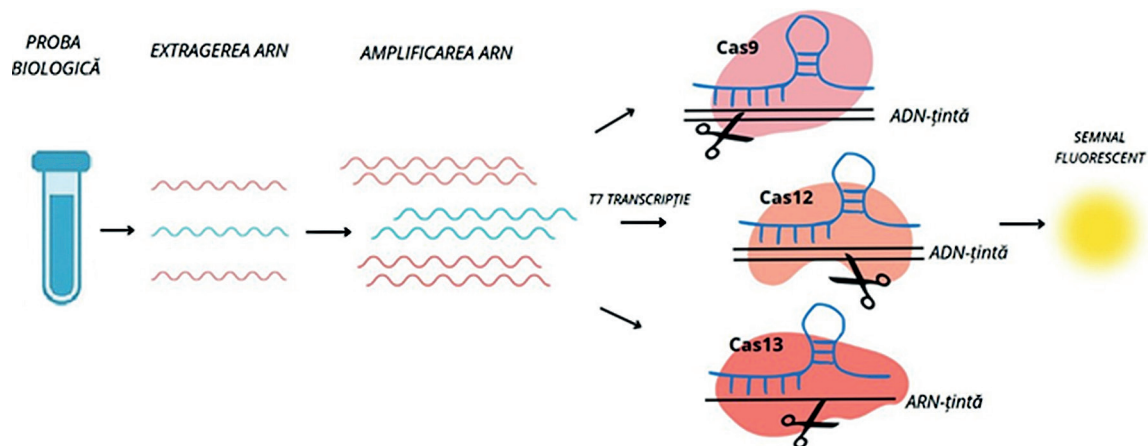


Figura 3. Mecanismul de acțiune a sistemelor CRISPR-Cas 9, Cas 12, Cas13

– fără semnal semnificativ [34]. De asemenea, se estimează o sensibilitate de 88.3% și o specificitate de 94-98%, în comparație cu alte metode, cum este cultura (33%) și Xpert (66%), denotând precizia acestui sistem în diagnosticul TB [33].

CRISPR-Cas13

Enzima Cas13 clivează doar secvențe de ARN, nu și ADN, efectuând două tipuri de clivare: cis și trans. Cis-clivarea presupune tăierea ARN-ului țintă, exact pe care îl "căută", pe când trans-clivarea (sau clivaj colateral) subînțelege activarea enzimei chiar și după tăierea secvenței-țintă, astfel încât clivează ARN-ul din jur. În cazul de față, este utilă activitatea colaterală, întrucât are loc adăugarea la ARN a unui reporter cu un fluorofor (ce va emite lumină) și un quencher (ce are drept scop limitarea emiterii de lumină). Ulterior, din moment ce ținta este determinată, se va declanșa un semnal luminos drept confirmare. Prima platformă care a utilizat această proprietate a Cas13 a fost

SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing), prin amplificarea ADN-ului de interes prin RPA (recombinase polymerase amplification), cu T7-ARN-polimeraza, care va transforma ADN-ul bacterian într-un ARN detectabil de către Cas13 [32].

În mod normal, mecanismul de acțiune urmează acești pași: colectarea probelor biologice de la pacienți, care, se presupune, prezintă rezistență la fluorochinolone; sintetizarea proteinei Cas13a, folosind o plasmidă cu ADN circular ce codifică o variantă a Cas13 umanizată, iar aceasta, introdusă fiind în bacterii E.coli, le stimulează să producă LwCas13a. În final, are loc extragerea, purificarea și stocarea ei. Următorul pas constă în obținerea secvențelor țintă – ARN-țintă și ARN-ghid. În primul rând, are loc sintetizarea regiunilor genei *gyrA* ce condiționează apariția rezistenței la fluorochinolone, se clonează în plasmide cu mutațiile respective, se

amplifică prin PCR, și, utilizând T7-ARN polimeraza, are loc transcrierea ADN în ARN monocatenar (ssARN). În al doilea rând, ARN-ghid se obține, la fel, prin transcrierea de către T7-ARN polimerază (Figura 3) dintr-un ADN monocatenar cu o secvență crARN complementară mutației. În continuare, are loc detectarea de către Cas13a, care, atunci când recunoaște ARN-ul țintă, clivează și ARN din preajma acesteia, deci manifestă activitate colaterală. Totodată, datorită unei sonde fluorescente, la activarea Cas13a, se va emana un semnal fluorescent, ce va confirma prezența mutației căutate [34].

Un alt studiu, care, de asemenea, a evaluat fezabilitatea sistemului CRISPR-Cas13 după aceleași principii ale cazului prezentat mai sus, a concluzionat că testul CRISPR pentru diagnosticarea MTB a avut o sensibilitate de până la 97.4%, mai înaltă decât sensibilitatea obținută prin cultura micobacteriană (71.6%) și prin frotiu AFB (48.5%), și a fost cel puțin la fel de sensibil ca GeneXpert/MTB/RIF (97.0%) [35].

CRISPR-Cas14a

Cas14 (uneori numit Cas12f) recunoaște ADN monocatenar sau ARN monocatenar, și posedă activitate de trans-clivare specifică pentru ADN-ul monocatenar. Totuși, Cas14 efectuează activitatea colaterală asupra altor molecule de ADN decât cele țintă, astfel secvența de interes este păstrată [32].

Într-un studiu publicat în 2025, a fost explorată activitatea sistemului CRISPR împreună cu enzima Cas14a, și anume pentru detectarea mutațiilor rezistente la rifampicină și isoniazidă. Cas14a este o nuclează ARN-ghidată și programabilă, țintește ADN-ul monocatenar, nu necesită PAM și depistează SNPs [13], [36]. Complexul CRISPR-Cas14a permite detecția simultană a rezistenței la RIF și INH, după o amplificare PCR a genelor *rpoB*, *katG*, *inhA* [13], [33].

Articolele de sinteză prezintă Cas12a, Cas13a, Cas14a ca fiind cele mai utilizate sisteme pentru detectarea acidului nucleic. Cas12a recunoaște ADN, iar Cas13a - ARN, activează mecanisme de clivare colaterală care permit semnalizare prin fluorescență sau benzi laterale (LF) [37–39].

CRISPR în diagnosticul specific al tuberculozei

Studiile aplicate au demonstrat sensibilitate înaltă a metodelor CRISPR-Cas13a în detecția *Mycobacterium tuberculosis* din probe clinice [37, 39]. Platformele LAMP-CRISPR, ERA-CRISPR și CRAFT combină amplificarea izotermă cu detecția CRISPR pentru rezultate rapide [41]. Alte studii au efectuat evaluări clinice care arată sensibilități înalte (>95%) și specificități remarcabile în comparație cu metodele convenționale (GeneXpert, PCR)[1-3,7].

Platformele multiplex CRISPR permit identificarea tulpinilor rezistente la medicamente [13, 42].

Cercetătorii au descoperit că bacteriile *Mycobacterium tuberculosis* rezistente la isoniazidă (din cauza mutațiilor în gena *katG*) dezvoltă vulnerabilități ascunse ca efect secundar al adaptării lor. Aceste vulnerabilități apar în procese esențiale precum respirația celulară, sinteza proteinelor și metabolismul aminoacizilor și nucleotidelor [17, 43].

Folosind tehnologia CRISPRi, transcriptomică și metabolomică, cercetătorii au cartografiat aceste puncte slabe și au arătat că ele pot fi țintite selectiv cu tratamente pentru a distruge tulpinile rezistente – inclusiv în probe clinice. Acest lucru oferă o nouă strategie pentru a trata tuberculoza rezistentă la medicamente, fără a fi nevoie dezvoltarea noilor antibiotice [43].

Compararea tehnologiilor bazate pe CRISPR-Cas cu metodele convenționale de diagnostic al tuberculozei

Sistemele de detecție moleculară bazate pe CRISPR-Cas (în special Cas12a, Cas13a și Cas14a) s-au dovedit efective în diagnosticul rapid al infecției cu MTB, în special în formele rezistente la medicamente. Analizele clinice disponibile indică o sensibilitate de minimum 93%, cu valori frecvente apropiate de 97–98%, și o specificitate ce atinge frecvent 100%, plasându-le în fața metodelor clasice de diagnostic [13,15, 44-45].

Prin comparație, microscopia Ziehl-Neelsen (AFB) rămâne o metodă accesibilă, dar cu o sensibilitate limitată (45–60%). Cultura bacteriană, considerată standardul de aur, prezintă o sensibilitate medie (60–70%) și timpi de obținere a rezultatului de ordinul săptămânilor. GeneXpert MTB/RIF, una dintre cele mai utilizate metode moleculare rapide, oferă sensibilități de 90–98% pentru TB pulmonară, însă are limitări în detectarea multor mutații asociate cu rezistența extinsă (ex. *katG*, *inhA*, *gyrA*) [4, 7, 31, 35].

În acest context, platformele Cas14a și Cas13a au demonstrat o superioritate distinctă în identificarea mutațiilor punctiforme asociate rezistenței la rifampicină (*rpoB*) și isoniazidă (*katG*) [13].

Unul dintre cele mai evidente avantaje ale tehnologiilor CRISPR este scurtarea radicală a timpului de diagnostic. Toate platformele CRISPR analizate funcționează în intervale de 30–90 de minute, în contrast cu cultura bacteriană (2–6 săptămâni) sau testele fenotipice de susceptibilitate (DST), care pot dura până la 4 săptămâni. Chiar și comparativ cu GeneXpert (aproximativ 2 ore), platformele CRISPR oferă rezultate mai rapide, facilitând astfel inițierea timpurie a tratamentului și reducerea transmiterii (Tabelul 1).

Tabel 1.

Caracteristici comparative dintre platforma CRISPR-Cas și metodele convenționale de diagnostic al tuberculozei

Caracteristică	CRISPR (Cas12a/13/14a)	Metode clasice (AFB, cultură, GeneXpert)
Timp de rezultat	30–90 min (uneori <1.5 h)	AFB: 1 zi, cultură: 2–6 săpt., Xpert: ~2 h
Sensibilitate	94–98%	AFB: 45–60%, cultură: 70–80%, Xpert: 90–98%
Specificitate	98–100%	Cultură: 98–100%, Xpert: ~95–98%
Detecție rezistență (RIF, INH)	Cas13a, Cas14a: >90–100%	pDST: de încredere, dar lent; GeneXpert: doar RIF
Tipuri de probe	Spută, BALF, puroi, sânge, ser, urină	În principal spută
Necesitate echipamente	Minimă (lateral flow, fluorescență vizuală)	Cultură: laborator BSL-3, GeneXpert: aparat dedicat
Aplicații în MDR-TB	Precizie crescută în identificarea mutațiilor	Limitată fără secvențiere sau DST extins

Tabel 2.

Platformele CRISPR-Cas analizate în studii clinice

Platformă	Tip CRISPR	Probe biologice	Obiectiv	Sensibilitate (%)	Specificitate (%)	Timpanaliză	Comparație metode clasice
CRISPR-Cas14a MTB RIF/INH [13]	Cas14a	Izolate clinice (n=60), spută (n=55)	Detectare RIF/INH rezistență	RIF: 93.3 / INH: 97.5	100	~1.5 h	Similară sau superioară pDST
CRISPR-MTB [35]	Cas13a	BALF, spută, puroi (n=401)	Detectare MTB	97.4	n/a	<1.5 h	AFB: 48.5%, cultură: 71.6%, GeneXpert: 97.0
CRISPR-Cas12a pentru Mtb intracelular [7]	Cas12a	BALF, macrofage (in vitro)	Detectare intracelulară MTB	94	100	~1 h	Cultură: 67%, Xpert: 78%
CRISPR-Cas12a ERA [29]	Cas12a	Spută (n=60)	Detectare MTB	100 (fluorescență) / 93.8 (LF)	100	~50 min	Timpan mai scurt, sensibilitate crescută
CLAP-TB (Cas12 + RT-LAMP) [53]	Cas12	Spută, urină, ser (n=232, 82 pacienți)	Detectare MTB	98.27	100	~1 h	Fără echipamente sofisticate

Diagnosticarea tuberculozei (TB), în special a formelor multidrog rezistente (TB-MDR), necesită metode rapide, sensibile și accesibile. Tehnologiile emergente bazate pe sistemul CRISPR-Cas, combinate cu tehnici izoterme precum RPA (Recombinase Polymerase Amplification), RAA (Recombinase-Aided Amplification) sau LAMP, au revoluționat diagnosticul molecular prin reducerea considerabilă a timpului și resurselor necesare [33, 46].

Astfel, utilizarea acestor metode permite detectarea rapidă și precisă a MTB, fiind adecvate pentru aplicarea directă în clinici sau la locul îngrijirii pacientului (point-of-care). Întregul proces CRISPR-Cas, de la extracția ADN-ului până la detectarea semnalului, poate fi finalizat într-un interval de la 30 minute până la 3 ore, în timp ce metodele clasice de cultură, necesită între 7-8 zile (cultura lichidă

BACTEC MGIT 960) și până la 4-8 săptămâni (medii solide Lowenstein-Jensen/Ogawa) pentru obținerea rezultatelor (Tabelul 1) [46-47].

Pe lângă avantajul vitezei, metoda CRISPR-Cas se distinge și prin costurile reduse: până la 0.1 USD/reacție pentru reagenți și aproximativ 7.4 USD/test în condiții de laborator simplificat [48]. Comparativ, costurile pentru cultura pe mediu solid sau lichid pot ajunge la 7.59 USD și 19.23 USD/test respectiv, în timp ce testele GeneXpert MTB/RIF Ultra ajung la 30–60 USD în țările dezvoltate [48].

Mai mult, CRISPR-Cas are o sensibilitate și specificitate superioară metodelor convenționale și permite detecția formelor pulmonare și extrapulmonare de TB-MDR, inclusiv din probe biologice variate, precum plasma sau lichidul cefalorahidian [14, 44, 46-47].

Metodele moleculare consacrate, precum GeneXpert MTB/RIF și Ultra, oferă rezultate în 66–120 minute, cu o sensibilitate care variază în funcție de tipul probei și statutul imunologic al pacientului (ex. 88% la pacienți HIV-pozitivi pentru TB pulmonară) [48].

Însă, aceste sisteme implică costuri semnificative și infrastructură specifică. Alte metode moleculare, precum MF-qRT-PCR sau tNGS (targeted Next-Generation Sequencing), deși precise (ex. sensibilitate de 97.2% și specificitate de 100% pentru rifampicină), presupun echipamente complexe, costuri ridicate și timp de procesare mai lung (1.5–20 h) [37, 49-50]. În plus, secvențierea metagenomică sau prin nanopore, deși promițătoare, rămâne limitată de lipsa datelor standardizate pentru identificarea mutațiilor asociate rezistenței [51].

Prin urmare, integrarea tehnologiilor CRISPR-Cas în practica clinică oferă o alternativă viabilă și eficientă la metodele clasice și molecular-convenționale, reprezentând un progres esențial pentru diagnosticarea rapidă, precisă și accesibilă a TB-MDR, în special în regiuni cu resurse limitate, avantajul acestei platforme reprezintă și posibilitatea de a analiza și identifica MTB în diferite tipuri de biosubstrate, caracteristicile comparative dintre aplicațiile CRISPR și metodele convenționale observate în diferite studii clinice sunt descrise în Tabelul 2.

Tehnologiile prin comparație cu metodele clasice precum cultura sau GeneXpert implică costuri de 7.59–60 USD/test, cerințe de laborator BSL-2 sau BSL-3, energie electrică constantă și personal specializat. CRISPR, în schimb, poate fi adaptat în formate portabile și semi-automatizate, ceea ce îl face ideal pentru testare de tip point-of-care [52], dar și în situațiile în care nu poate fi prelevată sputa.

Limitări și perspective.

Tehnologiile CRISPR-Cas (în special Cas12a, Cas13a, Cas14a) reprezintă o alternativă inovatoare, rapidă, accesibilă și precisă pentru diagnosticul TB și MDR-TB. Acestea pot transforma modul în care infecția este detectată în zone cu resurse limitate și pot scurta drastic timpul de inițiere a tratamentului, esențial în cazurile de TB rezistentă [13, 46].

Totuși, pentru implementare clinică largă sunt necesare: validări multicentrice, integrare în ghiduri clinice, producție la scară și standardizare.

Deși CRISPR oferă precizie ridicată, persistă provocări legate de stabilitatea enzimelor Cas, costuri și lipsa standardizării. Totuși, dezvoltările recente în CRISPRi screening [41] și abordările naked-eye deschid noi oportunități pentru diagnostic în punctul de îngrijire [53].

Fără amplificare prealabilă, calitatea detectării acizilor nucleici scade considerabil, deci scade sensibilitatea [54]. Echipamentele care citesc fluorescența ar putea fi insensibile la semnale slabe pentru detectarea precisă a unor ținte mici, precum o mutație frecventă, rară [54]. Din această cauză, o perspectivă în dezvoltarea CRISPR-Cas ar fi identificarea altor metode de citire a semnalului fluorescent, precum cele electrochimice, optice, nanopori.

CRISPR-Cas poate obține unele reacții nespecifice, din cauza intenției de a găsi mai multe ținte simultan (multiplexare), generând rezultate fals pozitive și afectând acuratețea testului.

Studiile care se efectuează la moment și cele viitoare prezic că metoda CRISPR-Cas va deveni o platformă potrivită pentru point-of-care (deci pentru efectuarea diagnosticului rapid la locul îngrijirii pacientului – în cabinetul medical, în zonele rurale ce nu dispun de laboratoare, respectiv elimină necesitatea de a trimite probele la un laborator).

Concluzie.

Tehnologia CRISPR-Cas poate deveni o opțiune de diagnostic molecular pentru identificarea *Mycobacterium tuberculosis*, fiind o metodă rapidă, cu sensibilitate și specificitate înaltă, cu potențial de implementare în zone cu resurse reduse. Pentru validarea clinică, standardizarea protocoalelor și integrarea în kituri portabile sunt necesare studii suplimentare.

Bibliografie.

- 1 Houben R.M.G.J., Dodd P.J. *The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling*. În: PLoS Med 2016, nr. 13, pp. e1002152. ISSN15491676.
- 2 2024 Global tuberculosis report. 2024.
- 3 Pandya K., Jagani D., Singh N. *CRISPR-Cas Systems: Programmable Nuclease Revolutionizing the Molecular Diagnosis*. În: Mol Biotechnol 2024, nr. 66, pp. 1739–1753. ISSN15590305.
- 4 Abavisani M. et al. *Mycobacterium tuberculosis Detection Using CRISPR Technology: An Updated Systematic Review and Meta-analysis*. În Mol Diagn Ther 2024, nr. 28, pp. 777–790. ISSN11792000.
- 5 Qi Y. et al. *CRISPR-Based Diagnostics: A Potential Tool to Address the Diagnostic Challenges of Tuberculosis*. În Pathogens, nr. 11. Epub ahead of print 20 October 2022. DOI: 10.3390/pathogens11101211. ISSN2076-0817.
- 6 Mukherjee S. et al. *Evolution of tuberculosis diagnostics: From molecular strategies to nanodiagnosics*. În Tuberculosis, nr. 140. Epub ahead of print 1 May 2023. DOI: 10.1016/j.tube.2023.102340. ISSN1873281X.
- 7 Zhang X. et al. *A new method for the detection of Mycobacterium tuberculosis based on the CRISPR/*

- Cas system*. În: BMC Infect Dis 2023, nr. 23, pp. 1–10. ISSN14712334.
- 8 Shmakov S. et al. *Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems*. În Nat Rev Microbiol 2017, nr. 15, pp. 169–182. ISSN17401534.
- 9 Augustin L., Agarwal N. *Designing a Cas9/gRNA-assisted quantitative Real-Time PCR (CARP) assay for identification of point mutations leading to rifampicin resistance in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis*. În Gene 2023, nr. 857, pp. 147173. ISSN0378-1119.
- 10 Li Q. et al. *Rapid and Highly Sensitive Detection of Mycobacterium tuberculosis Utilizing the Recombinase Aided Amplification-Based CRISPR-Cas13a System*. În Microorganisms 2024, nr. 12, pp. 1507. ISSN20762607.
- 11 Taufiq S. et al. *An electrochemical biosensor for the detection of tuberculosis specific DNA with CRISPR-Cas12a and redox-probe modified oligonucleotide*. În Heliyon 2024, nr. 10, pp. e40754. ISSN24058440.
- 12 Liu P. et al. *A Recombinase Polymerase Amplification-Coupled Cas12a Mutant-Based Module for Efficient Detection of Streptomycin-Resistant Mutations in Mycobacterium tuberculosis*. În Front Microbiol 2022, nr. 12, pp. 796916. ISSN1664302X.
- 13 Xiao G. et al. *Direct detection from sputum for drug-resistant Mycobacterium tuberculosis using a CRISPR-Cas14a-based approach*. În BMC Microbiol 2025, nr. 25, pp. 1–11. ISSN14712180.
- 14 Peng L. et al. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using CRISPR-Cas12b combined with cross-priming amplification in a single reaction*. În J Clin Microbiol, nr. 62. Epub ahead of print 1 January 2024. DOI: 10.1128/JCM.00923-23. ISSN1098660X.
- 15 Lin Z. et al. *Ultra-sensitive in situ detection of intracellular Mycobacterium tuberculosis with CRISPR/Cas12a*. În Front Immunol, nr. 16. Epub ahead of print 2025. DOI: 10.3389/FIMMU.2025.1597654. ISSN16643224.
- 16 Qiao Y. et al. *A chemiluminescent sensor based on CRISPR-HCR technology for the hypersensitive detection of Mycobacterium tuberculosis*. În Analytical Methods 2024, nr. 16, pp. 7927–7939. ISSN17599679.
- 17 Wang X.Y. et al. *Whole genome CRISPRi screening identifies druggable vulnerabilities in an isoniazid resistant strain of Mycobacterium tuberculosis*. În Nature Communications, nr. 15. Epub ahead of print 1 December 2024. DOI: 10.1038/S41467-024-54072-W ISSN20411723.
- 18 Padda I.S., Reddy K.M. *Antitubercular Medications*. În StatPearls.
- 19 Xiong X.S. et al. *Identification of Mycobacterium tuberculosis Resistance to Common Antibiotics: An Overview of Current Methods and Techniques*. În Infect Drug Resist 2024, nr. 17, pp. 1491–1506. ISSN11786973.
- 20 Liu Q. et al. *Drug resistance gene mutations and treatment outcomes in MDR-TB: A prospective study in Eastern China*. În PLoS Negl Trop Dis 2021, nr. 15, pp. e0009068. ISSN19352735.
- 21 Khan A.S. et al. *Genetic mutations underlying isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan*. În Tuberculosis, nr. 138. Epub ahead of print 1 January 2023. DOI: 10.1016/j.tube.2022.102286. ISSN1873281X.
- 22 Islam M.M. et al. *Phenotypic and Genotypic Characterization of Streptomycin-Resistant Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates in Southern China*. În Microbial Drug Resistance 2020, nr. 26, pp. 766–775. ISSN19318448.
- 23 Cao G. et al. *Completely Free from PAM Limitations: Asymmetric RPA with CRISPR/Cas12a for Nucleic Acid Assays*. În ACS Sens 2023, nr. 8, pp. 4655–4663. ISSN23793694.
- 24 Dai J. et al. *Exploiting the Potential of Spherical PAM Antenna for Enhanced CRISPR-Cas12a: A Paradigm Shift toward a Universal Amplification-Free Nucleic Acid Test Platform*. În Anal Chem 2025, nr. 97, pp. 1236–1245. ISSN15206882.
- 25 Riordan S.M. et al. *Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries*. În Cell Biosci 2015, nr. 5, pp. 1–11. ISSN20453701.
- 26 Zhou M. et al. *The construction of CRISPR/Cas9-mediated FRET 16S rDNA sensor for detection of Mycobacterium tuberculosis*. În Analyst 2023, nr. 148, pp. 2308–2315. ISSN1364-5528.
- 27 *View of CRISPR-Cas9-based electrochemical biosensor for the detection of katG gene mutations in isoniazid-resistant tuberculosis*, <https://pub.iapchem.org/ojs/index.php/admet/article/view/2766/2519> (accessed 29 June 2025).
- 28 Le T.H.U.T.H.U.Y., Huang Y., Xie J.P. *Application and optimization of CRISPRi to the biology of Mycobacterium tuberculosis*. În Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 2024, nr. 47, pp. 376–382. ISSN1001-0939.
- 29 Gan T. et al. *ERA-CRISPR/Cas12a system: a rapid, highly sensitive and specific assay for Mycobacterium tuberculosis*. În Front Cell Infect Microbiol, nr. 14. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.3389/FCIMB.2024.1454076 ISSN22352988.
- 30 Yang L. et al. *CRISPR-Cas12a-Based Rapid and Sensitive Detection of rpoB L378R in Mycobacterium tuberculosis*. Epub ahead of print 7 June 2023. DOI: 10.1101/2023.06.06.543922.
- 31 Deng Z. et al. *Rapid and sensitive detection of Mycobacterium tuberculosis using the RPA/Cas12f1_ge4.1 system with fluorescence and lateral flow readouts*. În Microbiol Spectr, nr. 13. Epub ahead of print 9 July 2025. DOI: 10.1128/SPECTRUM.02652-24. ISSN2165-0497.
- 32 Qian X. et al. *CRISPR for companion diagnostics in low-resource settings*. În Lab Chip 2024, nr. 24, pp. 4717–4740. ISSN1473-0189.
- 33 Lyu C. et al. *CRISPR-based biosensing is prospective for rapid and sensitive diagnosis of pediatric tuberculosis*. În International Journal of Infectious Diseases 2020, nr. 101, pp. 183–187. ISSN1201-9712.
- 34 Bai X. et al. *A Highly Sensitive and Specific Detection Method for Mycobacterium tuberculosis Fluoroquinolone Resistance Utilizing the*

CRISPR-Cas13a System. În *Front Microbiol* 2022, nr. 13, pp. 847373. ISSN1664302X.

35 Ren W. et al. *Development and clinical evaluation of a CRISPR/Cas13a-based diagnostic test to detect Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens*. În *Front Microbiol* 2023, nr. 14, pp. 1117085. ISSN1664302X.

36 Harrington L.B. et al. *Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes*. În *Science* (1979) 2018, nr. 362, pp. 839–842. ISSN10959203.

37 Kostyusheva A. et al. *CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases*. În *Methods* 2022, nr. 203, pp. 431–446. ISSN10959130.

38 Padmanaban V., Ranganathan U.D.K. *CRISPR–Cas system and its use in the diagnosis of infectious diseases*. În *Microbiol Res*, nr. 263. Epub ahead of print 1 October 2022. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127100. ISSN09445013.

39 Chakraborty J. et al. *CRISPR/Cas-Based Biosensor As a New Age Detection Method for Pathogenic Bacteria*. În *ACS Omega* 2022, nr. 7, pp. 39562–39573. ISSN24701343.

40 Shi M. et al. *EspB and HtpG interact with the type III-A CRISPR/Cas system of Mycobacterium tuberculosis*. În *Front Mol Biosci* 2023, nr. 10, pp. 1261613. ISSN2296889X.

41 Wang Y. et al. *LAMP-CRISPR-Cas12-based diagnostic platform for detection of Mycobacterium tuberculosis complex using real-time fluorescence or lateral flow test*. În *Microchimica Acta*, nr. 188. Epub ahead of print 1 October 2021. DOI: 10.1007/S00604-021-04985-W ISSN14365073.

42 Wu K., Wu Z., Li X. *Clinical diagnostic value of CRISPR-Cas13a-based molecular technology for tuberculosis*. În *Ir J Med Sci* 2024, nr. 193, pp. 2889–2895. ISSN1863-4362.

43 Wang X.Y. et al. *Whole genome CRISPRi screening identifies druggable vulnerabilities in an isoniazid resistant strain of Mycobacterium tuberculosis*. În *Nat Commun* 2024, nr. 15, pp. 9791. ISSN20411723.

44 Thakku S.G. et al. *Genome-wide tiled detection of circulating Mycobacterium tuberculosis cell-free DNA using Cas13*. În *Nat Commun*, nr. 14. Epub ahead of print 1 December 2023. DOI: 10.1038/S41467-023-37183-8 ISSN20411723.

45 Wang J. et al. *High-Performance Detection of Mycobacterium bovis in Milk Using Recombinase-Aided Amplification–Clustered Regularly Interspaced Short*

Palindromic Repeat–Cas13a–Lateral Flow Detection. În *Foods*, nr. 13. Epub ahead of print 1 June 2024. DOI: 10.3390/FOODS13111601 ISSN23048158.

46 Lyu C. et al. *CRISPR-based biosensing is prospective for rapid and sensitive diagnosis of pediatric tuberculosis*. În *International Journal of Infectious Diseases* 2020, nr. 101, pp. 183–187. ISSN18783511.

47 Cabibbe A.M. et al. *Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples*. În *J Clin Microbiol*, nr. 58. Epub ahead of print October 2020. DOI: 10.1128/JCM.00632-20/SUPPL_FILE/JCM.00632-20-SD002.XLSX. ISSN1098660X.

48 Cates L. et al. *Laboratory costs of diagnosing TB in a high multidrug-resistant TB setting*. În *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2021, nr. 25, pp. 228. ISSN18157920.

49 Shetty A. et al. *Revolutionizing Tuberculosis Management With Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Cas Technology: A Comprehensive Literature Review*. În *Cureus*, nr. 16. Epub ahead of print 17 October 2024. DOI: 10.7759/CUREUS.71697 ISSN2168-8184.

50 Zein-Eddine R. et al. *The future of CRISPR in Mycobacterium tuberculosis infection*. În *J Biomed Sci*, nr. 30. Epub ahead of print 1 December 2023. DOI: 10.1186/S12929-023-00932-4 ISSN14230127.

51 Akaçin İ. et al. *Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics*. În *Microbiol Res* 2022, nr. 264, pp. 127154. ISSN0944-5013.

52 Hassan Y.M. et al. *Recent developments and future directions in point-of-care next-generation CRISPR-based rapid diagnosis*. În *Clin Exp Med*, nr. 25. Epub ahead of print 1 December 2025. DOI: 10.1007/S10238-024-01540-8 ISSN15919528.

53 Kaushik A. et al. *Establishment and evaluation of a naked-eye diagnostic assay for tuberculosis utilizing reverse isothermal amplification-assisted CRISPR-Cas in resource-limited settings*. În *Drug Target Insights* 2025, nr. 19, pp. 31–40. ISSN11773928.

54 Li H. et al. *Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives*. În *Chem Soc Rev* 2023, nr. 52, pp. 361–382. ISSN1460-4744.