

УДК 577.21

БЫСТРАЯ ДЕТЕКЦИЯ ГЕНА *blaTEM* У *ACINETOBACTER BAUMANNII* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ RPA И СИСТЕМЫ CRISPR/CAS12A

Аманжолова Меруерт^{1,2}, Акимбекова Айнура¹, Шайзадинова Айша¹, Сутимбекова Назгуль³, Бисенова Неля⁴, Тарлыков Павел¹, Абельденов Сайлау^{1,*}

¹ Национальный центр биотехнологии, Шоссе Коргалжын 13/5, Астана, 010000, Казахстан;

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, проспект Аль-Фараби, здание 71, Алматы, 050040, Казахстан;

³ Медицинский университет Астана, проспект Сарыарка, здание 33, 010000, Астана, Казахстан;

⁴ Национальный научный медицинский центр, проспект Абылай хана, здание 42, 010000, Астана, Казахстан;

* Корреспондент: abeldenov@biocenter.kz

АННОТАЦИЯ

Антибиотикорезистентность является одной из ключевых проблем современной медицины, особенно в отношении внутрибольничных инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii*, обладающим высокой способностью к накоплению генов лекарственной устойчивости. Одним из генов устойчивости к β-лактамам является *blaTEM*, играющий важную роль в формировании резистентности у грамотрицательных микроорганизмов, включая *Acinetobacter baumannii*. Стандартные молекулярно-генетические методы выявления генов антибиотикорезистентности, включая ПЦР и ПЦР в реальном времени, требуют использования термоциклирующего оборудования. В связи с этим разработка изотермических методов амплификации с альтернативными способами регистрации результата представляет интерес для лабораторий с ограниченной приборной базой. В связи с этим, перспективным направлением является использование методов изотермической амплификации в сочетании с CRISPR/Cas-системами для разработки и оценки чувствительности метода детекции целевых генов. Целью данного исследования являлась разработка и оценка чувствительности метода детекции гена *blaTEM* на основе рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) в сочетании с системой CRISPR/Cas12a. В ходе исследования показано, что метод РПА обеспечивает специфическую амплификацию целевого гена с пределом детекции 10⁴ копий/реакцию. Полученные результаты подтверждают принципиальную работоспособность системы RPA-CRISPR/Cas12a для выявления фрагмента гена *blaTEM* и флуоресцентной регистрации продукта амплификации.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, *blaTEM*, антибиотикорезистентность, РПА, CRISPR/Cas12a, изотермическая амплификация, молекулярная диагностика

1. ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины, представляя серьёзную угрозу для систем здравоохранения во всём мире [1, 2]. Особую опасность представляют внутрибольничные инфекции, вызванные микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью. К числу таких патогенов относится *Acinetobacter baumannii*, входящий в группу ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter* spp.), характеризующуюся способностью эффективно избегать действия большинства антибиотиков [3]. *A. baumannii* ассоциирован с развитием тяжёлых инфекций, включая пневмонию, сепсис, инфекции мочевыводящих путей и раневые инфекции, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [4].

Высокая клиническая значимость *A. baumannii* обусловлена его способностью к длительному выживанию в условиях стационара, формированию биоплёнок и накоплению генов антибиотикорезистентности [5]. Распространение устойчивых штаммов в медицинских учреждениях сопровождается увеличением заболеваемости, длительности госпитализации и летальности, что делает данный патоген приоритетным объектом для разработки новых методов диагностики и контроля.

Одним из ключевых механизмов устойчивости *A.*

baumannii является продукция β-лактамаз – ферментов, разрушающих β-лактамы антибиотиков [6]. Гены, кодирующие данные ферменты, часто локализованы на мобильных генетических элементах, таких как плазмиды, что способствует их быстрому горизонтальному переносу между бактериями [7]. Среди них особое значение имеет ген *blaTEM* [8, 9], широко распространённый среди грамотрицательных микроорганизмов и играющий важную роль в формировании устойчивости к пенициллинам и цефалоспорином.

Молекулярно-генетические методы, включая ПЦР и ПЦР в реальном времени, широко применяются для выявления генов антибиотикорезистентности. Эти методы обеспечивают специфическую амплификацию целевых последовательностей, однако требуют использования термоциклирующего оборудования и соответствующей лабораторной инфраструктуры. Поэтому сохраняется интерес к изотермическим методам амплификации, которые проводятся при постоянной температуре и потенциально могут упростить аппаратное обеспечение анализа. Вместе с тем аналитические характеристики таких методов должны оцениваться путем прямого сравнения с установленными молекулярно-генетическими подходами.

В последние годы всё большее внимание уделяется технологиям на основе CRISPR/Cas, которые активно применяются не только для редактирования генома, но и для молекулярной диагностики инфекционных заболеваний и генов антибиотикорезистентности [10]. Особый

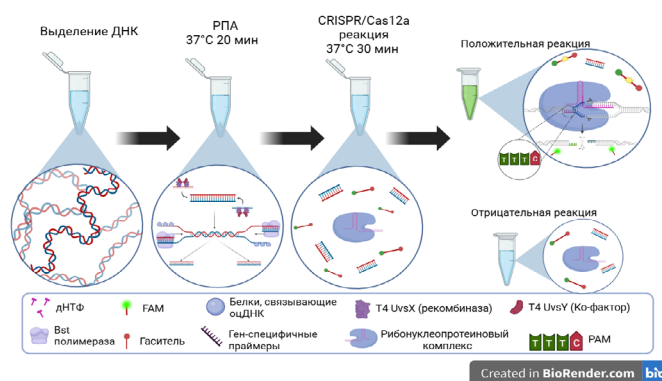


Рисунок 1. Схематическое изображение детекции целевого гена с помощью РПА-CRISPR/Cas технологии. На первом этапе осуществляли выделение ДНК из исследуемого образца. Далее проводили РПА при 37°C в течение 20 минут. В ходе реакции рекомбиназа T4 UvsX совместно с ко-фактором T4 UvsY обеспечивала связывание праймеров с гомологичными участками целевой ДНК, а Bst-полимераза осуществляла синтез новых цепей ДНК. Полученные продукты РПА использовали для последующей детекции с применением системы CRISPR/Cas12a. Рибонуклеопротеиновый комплекс Cas12a-crPHK специфически распознавал целевую последовательность, содержащую РАМ-мотив (protospacer adjacent motif – короткая консервативная последовательность, необходимая для связывания и активации Cas12a), после чего активировалась коллатеральная нуклеазная активность белка Cas12a. Это сопровождалось неспецифическим расщеплением одноцепочечного ДНК-репортера, меченного флуорофором FAM и гасителем, что приводило к появлению флуоресцентного сигнала. При наличии целевой последовательности наблюдалась положительная флуоресцентная реакция, тогда как в отрицательном контроле расщепление репортера и генерация сигнала отсутствовали.

интерес представляет система CRISPR/Cas12a, способная после распознавания специфической целевой последовательности активировать коллатеральную нуклеазную активность и осуществлять неспецифическое расщепление одноцепочечных ДНК-репортеров [11], содержащих флуорофор (FAM) и гаситель, что сопровождается появлением флуоресцентного сигнала [12]. Благодаря высокой специфичности распознавания и возможности визуальной регистрации результатов CRISPR/Cas12a рассматривается как перспективный инструмент для создания быстрых и чувствительных диагностических платформ [13].

Для повышения чувствительности CRISPR-диагностики широко используются методы изотермической амплификации, позволяющие предварительно увеличить количество целевой ДНК без применения сложного оборудования. Одним из наиболее перспективных методов является рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА), обеспечивающая амплификацию нуклеиновых кислот при постоянной температуре без использования амплификатора [14]. Комбинирование РПА и CRISPR/

Cas12a рассматривается как перспективный подход к выявлению генов антибиотикорезистентности [15, 16]. На первом этапе РПА обеспечивает амплификацию целевого фрагмента ДНК в изотермических условиях. На втором этапе комплекс Cas12a-crPHK распознает специфическую последовательность внутри полученного ампликона и активирует расщепление флуоресцентного репортера, что позволяет визуально регистрировать результат.

Целью настоящего исследования являлись разработка и предварительная аналитическая оценка системы выявления фрагмента гена *blaTEM* на основе РПА с последующей CRISPR/Cas12a-опосредованной флуоресцентной регистрацией продукта амплификации. Общая схема выявления фрагмента гена *blaTEM* с использованием РПА в сочетании с CRISPR/Cas12a представлена на рисунке 1.

Для визуализации взаимодействия компонентов системы CRISPR/Cas12a в качестве модели была взята структура рибонуклеопротеинового комплекса Cas12a-crPHK в присутствии целевой последовательности (PDB ID: 6I1K). Модель демонстрирует взаимодействие белка

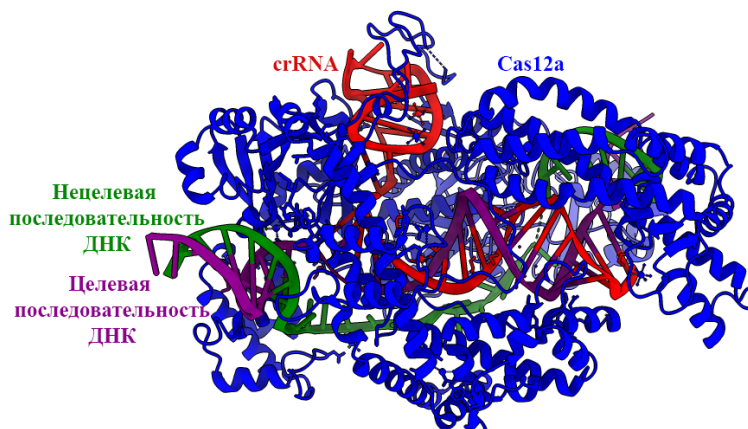


Рисунок 2. Рибонуклеопротеиновый комплекс с целевой последовательностью. Синим цветом выделен Cas12a, красным цветом – направляющая РНК и зеленым цветом – нецелевая последовательность ДНК и фиолетовым цветом – целевая последовательность ДНК.

Cas12a с направляющей РНК и целевой последовательностью ДНК. Как показано на рисунке 2, белок Cas12a формирует стабильный комплекс с crРНК, обеспечивающий распознавание специфического участка гена. При этом направляющая РНК обеспечивает комплементарное связывание с целевой последовательностью ДНК, что является необходимым условием для последующей активации нуклеазной активности Cas12a.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Бактериальные штаммы

В исследовании использовали геномную ДНК бактериальных штаммов *Acinetobacter baumannii*, содержащих ген *blaTEM* и лабораторные штаммы *Escherichia coli* DH5α для получения плазмидной ДНК.

2.2 Клонирование целевого гена

Ген *blaTEM* амплифицировали с использованием специфических праймеров с последующим клонированием в плазмидный вектор. Полученный амплификационный продукт очищали и использовали в реакции лигирования для получения рекомбинантной конструкции. Клонирование осуществляли с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, K1231) в соответствии с протоколом производителя.

После проведения реакции лигирования полученным продуктом трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Трансформированные клетки высевали на селективную питательную среду с антибиотиком и инкубировали при 37°C в течение 16–18 часов. Наличие вставки гена *blaTEM* в плазмидном векторе подтверждали методом ПЦР и секвенированием, после чего полученные рекомбинантные плазмиды использовали в качестве положительного контроля и матрицы для оценки чувствительности метода.

2.3 Выделение ДНК

Плазмидную ДНК, содержащую ген *blaTEM*, использовали в качестве матрицы для проведения реакций амплификации и последующей детекции. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора Monarch® Plasmid Miniprep Kit #1010 для очистки плазмидной ДНК в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и степень чистоты полученной ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Полученные образцы использовали непосредственно после выделения либо хранили при температуре –20°C до дальнейшего использования.

2.4 Праймеры и дизайн

Для амплификации гена *blaTEM* использовали специфические праймеры. Дизайн праймеров для рекомбиназной полимеразной амплификации проводился в программе Vector NTI v11, с учетом рекомендаций производителя Twistdx. При проектировании учитывали длину амплифицируемого фрагмента и температурные характеристики праймеров.

2.5 РПА-амплификация

Амплификацию гена *blaTEM* проводили методом рекомбиназной полимеразной амплификации с использованием коммерческого набора (TwistDx, Великобритания) в

соответствии с рекомендациями производителя. Реакционную смесь общим объемом 50 мкл готовили путем объединения лиофилизированного реакционного пеллета, 480 нМ каждого праймера, реакционного буфера, плазмидной ДНК и деионизированной воды. Реакцию активировали добавлением ацетата магния до конечной концентрации 14 мМ. Амплификацию проводили при постоянной температуре 37°C в течение 20 минут. Полученные продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете.

2.6 Оценка аналитической чувствительности

Чувствительность метода оценивали с использованием серийных десятикратных разведений плазмидной ДНК, содержащей ген *blaTEM*. Разведения использовали в качестве матрицы для проведения реакции РПА. Предел детекции определяли как минимальное количество ДНК, при котором наблюдалась воспроизводимая амплификация целевого фрагмента.

2.7 Синтез направляющей РНК

Направляющую РНК, специфичную к гену *blaTEM*, проектировали с учетом наличия протоспейсер-ассоциированного мотива (PAM) в целевой последовательности. Для получения crRNA использовали метод *in vitro* транскрипции на основе T7-промотора. ДНК-матрицу формировали путем отжига синтетических олигонуклеотидов, после чего проводили транскрипцию и очистку полученной РНК проводили согласно протоколу производителя. Концентрацию crRNA определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США), после чего образцы хранили при температуре –80°C до использования.

2.8 CRISPR/Cas12a детекция

Для детекции продуктов амплификации использовали систему CRISPR/Cas12a. Комплекс Cas12a-crRNA формировали путем предварительной инкубации белка Cas12a и crRNA при конечной концентрации 100 нМ каждого компонента при комнатной температуре в течение 15 минут. Далее к реакционной смеси добавляли продукт РПА-амплификации и флуоресцентный репортер, содержащий метку FAM и гаситель флуоресценции. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 минут. После распознавания целевой последовательности активировалась коллатеральная нуклеазная активность Cas12a, приводящая к неспецифическому расщеплению одноцепочечного ДНК-репортера и появлению флуоресцентного сигнала. Результаты регистрировали с использованием трансиллюминатора и фотографировали на сотовый телефон.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Получение положительного контроля

Был амплифицирован ген *blaTEM* с использованием специфических праймеров: прямой праймер 5' AAACGCTGGTGAAAGTA 3', обратный праймер 5' AGCGATCTGTCTAT 3' [9]. Результаты агарозного гель-электрофореза продемонстрировали наличие ДНК-фрагмента длиной 752 пар оснований, что подтверждает амплификацию целевого гена, что показано на рисунке 3.

Полученный амплификационный продукт был исполь-

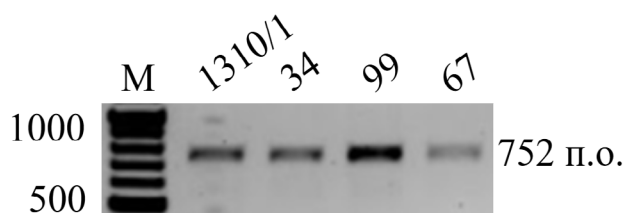


Рисунок 3. Электрофорез продукта ПЦР амплификации гена *blaTEM* в геномных ДНК клинических изолятов *A. baumannii*, М – маркер.

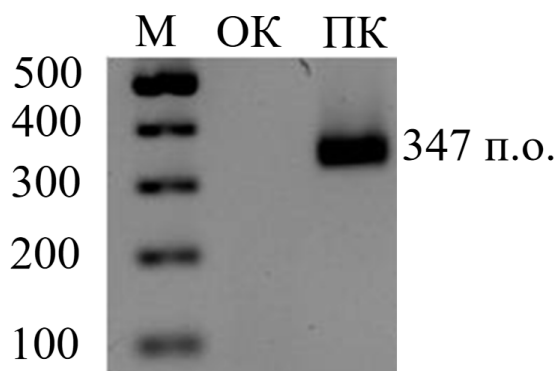


Рисунок 4. Электрофореограмма рекомбинантной полимеразной амплификации гена *blaTEM*. М – маркер, ОК – отрицательный контроль, ПК – положительный контроль

зован для клонирования в плазмидный вектор. После проведения реакции лигирования и трансформации была получена плазмидная конструкция, содержащая вставку гена *blaTEM*.

Полученная рекомбинантная плаزمида использовалась в качестве положительного контроля и стандартизированной матрицы для последующих экспериментов, включая оценку чувствительности метода РПА.

Таким образом, на данном этапе была получена плазмидная конструкция, содержащая ген *blaTEM*, обеспечивающая стабильный и воспроизводимый источник целевой ДНК.

3.2 Амплификация гена *blaTEM* методом РПА

Для оценки возможности РПА для детекции гена *blaTEM* была проведена амплификация с использованием специфических праймеров: прямой праймер 5' GGTATTA TCCCGTGTAGACGCCGGCAAGAGCAAC 3', обратный праймер 5' TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTG 3'.

В результате реакции был получен амплификационный продукт с размером 347 пар оснований, что подтверждалось методом агарозного гель-электрофореза на рисунке 4.

3.3 Оценка чувствительности метода РПА

Для определения предела чувствительности метода РПА были проведены серийные десятикратные разведения плазмидной ДНК, содержащей ген *blaTEM*.

Амплификация проводилась для каждого разведения с последующим анализом продуктов методом гель-электрофореза. По мере снижения концентрации ДНК наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности ампли-

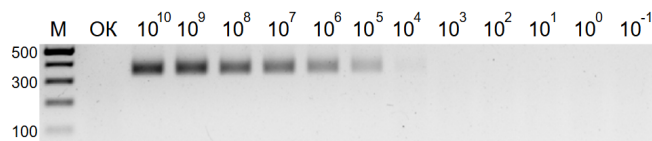


Рисунок 5. Электрофореограмма лимита детекции рекомбинантной полимеразной амплификации М – маркер, ОК – отрицательный контроль.

конов на геле, что видно на рисунке 5.

Предел детекции определяли как минимальную концентрацию ДНК, при которой сохранялась воспроизводимая амплификация целевого фрагмента.

Предел детекции составил 10^4 копий/реакцию.

Полученные результаты свидетельствуют о чувствительности метода РПА для выявления гена *blaTEM* даже при низкой концентрации матрицы.

3.4 Синтез crRNA методом *in vitro* транскрипции

Для получения РНК использовали метод *in vitro* транскрипции с применением Т7 РНК-полимеразы. В качестве матрицы использовали синтетический двухцепочечный ДНК-фрагмент, содержащий последовательность Т7-промотора и целевой участок для синтеза РНК,

crRNA_TEM_TTTC 5' TTGGTTGAGTACTCAC CAGTCACAATCTACAAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAGAATT 3' crRNA_short 5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGG 3'.

3.5 Детекция гена *blaTEM* с использованием CRISPR/Cas12a

Для флуоресцентной визуализации гена *blaTEM* была использована система CRISPR/Cas12a с флуоресцентной регистрацией сигнала.

Флуоресцентный сигнал был визуализирован при облучении ультрафиолетовым светом, что свидетельствовало о детекции гена *blaTEM*.

Чувствительность комбинированного метода оценивали с использованием серийных разведений плазмидной ДНК.

Было установлено, что применение системы CRISPR/Cas12a обеспечивает флуоресцентную детекцию продуктов амплификации и более удобную визуализацию результатов по сравнению с использованием только РПА и гель-электрофореза. При этом предел детекции комбинированного метода составил 10^4 копий/реакцию, что соответствовало чувствительности РПА в используемых условиях эксперимента (Рисунок 6).

Предел детекции для РПА-CRISPR/Cas12a составил 10^4 копий/реакцию.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают принципиальную возможность амплификации целевого фрагмента в изотермических условиях и последующего формирования визуально регистрируемого флуоресцентного сигнала. РПА проводилась при 37 °C в течение 20 минут. Его потенциальное назначение заключается в дополнительном выявлении целевых генов в условиях, где доступ к программируемому термоциклеру и централизованной лабо-

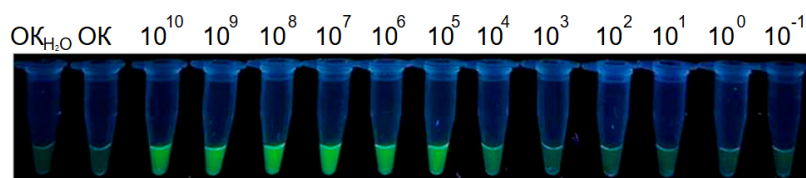


Рисунок 6. Флуоресцентная детекция гена *blaTEM* с использованием системы РПА-CRISPR/Cas12a при серийных разведениях матрицы. ОКН₂O – отрицательный контроль, ОК – в качестве матрицы использовался отрицательный контроль РПА.

раторной инфраструктуре ограничен. Разработанный метод РПА-CRISPR/Cas12a не рассматривается как замена валидированным ПЦР-основанным методам. Вместе с тем возможность применения метода в формате point-of-care требует дальнейшей оптимизации пробоподготовки, разработки закрытого формата реакции и валидации на клинических образцах. Прямое экспериментальное сравнение разработанной системы с ПЦР и ПЦР в реальном времени в настоящей работе не проводилось и стоимость одной реакции в настоящем исследовании не оценивалась.

Минимальное количество плазмидной матрицы, при котором регистрировался положительный результат, составило 10^4 копий/реакцию. Сопоставимое значение было получено Gao et al. при РПА-CRISPR/Cas12a-выявлении гена *tesA* [17]. Вместе с тем различия в генетических мишенях, матрицах, объемах реакций и критериях определения положительного сигнала ограничивают прямое сравнение между исследованиями. Полученный результат характеризует аналитическую обнаруживающую способность разработанного метода, но не его клиническую чувствительность. Использование плазмидной конструкции, содержащей ген *blaTEM*, позволило создать стабильную модель для определения предела детекции и обеспечить получение стандартизированной матрицы для оценки минимальной обнаруженной концентрации.

Включение CRISPR/Cas12a не изменило минимальную обнаруженную концентрацию по сравнению с РПА. В используемом формате Cas12a обеспечивала распознавание внутренней последовательности РПА-ампликона и конечную флуоресцентную регистрацию результата без проведения гель-электрофореза. Возможное повышение аналитической специфичности требует отдельного экспериментального подтверждения.

При последовательном выполнении этапов продолжительность анализа после получения ДНК составляла 55 минут: 20 минут для РПА, 15 минут для формирования комплекса Cas12a-crRNA и 20 минут для CRISPR/Cas12a-реакции. Это время не включает выделение ДНК и приготовление реакционных смесей.

В разработанном формате результат регистрировали визуально с использованием источника УФ-излучения. Такой вариант детекции не требует проведения гель-электрофореза на этапе конечной регистрации РПА-CRISPR/Cas12a-реакции, однако предполагает наличие устройства для поддержания температуры 37 °С, оборудования для пробоподготовки и источника света для визуализации флуоресценции. Поэтому требования к оборудованию и практическая продолжительность анализа должны оцениваться с учетом всех этапов - от выделения ДНК до интерпретации результата

ПЦР применялась для получения и подтверждения целого фрагмента *blaTEM*, но не использовалась как полноценный метод сравнения аналитических характеристик. В дальнейших исследованиях необходимо сопоставить методы по пределу детекции, аналитической специфичности, воспроизводимости, общей продолжительности и частоте совпадения результатов на клинических изолятах.

Разработка методов выявления генов антибиотикорезистентности, основанных на изотермической амплификации, может представлять интерес для лабораторий с ограниченной доступностью термоциклирующего оборудования. Вместе с тем результаты настоящего исследования характеризуют только предварительную аналитическую работоспособность системы. Для оценки возможности ее практического применения необходимо провести прямое сравнение с референсными молекулярно-генетическими методами, исследовать репрезентативную коллекцию клинических изолятов и стандартизировать этапы пробоподготовки и интерпретации результата.

Экспериментальная специфичность системы в настоящем исследовании не оценивалась. Потенциальными причинами ложноположительных результатов могут быть неспецифическая РПА-амплификация и контаминация продуктами амплификации. Ложноотрицательные результаты могут быть связаны с несовпадениями в участках связывания праймеров и crRNA, изменениями РАМ-последовательности, низким содержанием матрицы или присутствием ингибиторов. Поэтому специфичность системы необходимо дополнительно оценить на панели близкородственных генов β -лактамаз и отрицательных образцов.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании разработана система выявления фрагмента гена *blaTEM* на основе РПА с последующей CRISPR/Cas12a-опосредованной флуоресцентной регистрацией. Эксперименты с рекомбинантной плазмидной ДНК подтвердили принципиальную работоспособность предложенной схемы. В использованных условиях минимальное количество плазмидной матрицы, при котором регистрировался положительный результат, составило 10^4 копий/реакцию как для РПА, так и для комбинированной системы РПА-CRISPR/Cas12a.

Применение РПА позволяет проводить амплификацию в изотермических условиях, а Cas12a обеспечивает флуоресцентную регистрацию продукта реакции. Вместе с тем прямое сравнение с ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также клиническая валидация системы в настоящем исследовании не проводились. Дальнейшая оценка должна включать определение аналитической специфичности и воспроизводимости, исследование клинических изолятов и сопоставление результатов с референсным молеку-

лярно-генетическим методом.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация — А.С.; методология — А.М., А.А. и Ш.А.; проведение исследования — А.М.; предоставление ресурсов и материалов — С.Н. и Б.Н.; формальный анализ — А.М.; визуализация — Ш.А.; подготовка первоначального варианта рукописи — А.М.; рецензирование и редактирование рукописи — А.М. и А.С.; администрирование проекта — Т.П.; получение финансирования — Т.П. Все авторы прочитали и одобрили окончательную версию рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это исследование выполнено в рамках НТП BR24992881, финансируемой Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 // *Lancet*, 2024, Vol. 404(10459). – P. 1199-1226. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)01867-1)

Sharma R., Lakhanpal D. *Acinetobacter baumannii*: A comprehensive review of global epidemiology, clinical implications, host interactions, mechanisms of antimicrobial resistance and mitigation strategies // *Microb Pathog*, 2025, Vol. 204(– P. 107605. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107605>

Aggarwal R., Mahajan P., Pandiya S., Bajaj A., Verma S. K., Yadav P., Kharat A. S., Khan A. U., Dua M., Johri A. K. Antibiotic resistance: a global crisis, problems and solutions // *Crit Rev Microbiol*, 2024, Vol. 50(5). – P. 896-921. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2313024>

Bergogne-Bérézin E., Towner K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features // *Clin Microbiol Rev*, 1996, Vol. 9(2). – P. 148-165. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.2.148>

Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z. D., Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms // *Pathogens*, 2021, Vol. 10(3). – P. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>

Wang M., Ge L., Chen L., Komarow L., Hanson B., Reyes J., Cober E., Alenazi T., Zong Z., Xie Q., Liu Z., Li L., Yu Y., Gao H., Kanj S. S., Figueroa J., Herc E., Cordova E., Weston G., Ananth Tambyah P., Garcia-Diaz J., Kaye K. S., Dhar S., Munita J. M., Salata R. A., Vilchez S., Stryjewski M. E., Villegas Botero M. V., Iovleva A., Evans S. R., Baum K., Hill C., Kreiswirth B. N., Patel R., Paterson D. L., Arias C. A., Bonomo R. A., Chambers H. F., Fowler V. G., Jr., Satlin M. J., van Duin D., Doi Y. Clinical Outcomes and Bacterial Characteristics of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Among Patients From Different Global Regions // *Clin Infect Dis*, 2024, Vol. 78(2). – P. 248-258. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad556>

Castañeda-Barba S., Top E. M., Stalder T. Plasmids, a molecular cornerstone of antimicrobial resistance in the One Health era // *Nat Rev Microbiol*, 2024, Vol. 22(1). – P. 18-32. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00926-x>

Davin-Regli A., Lavigne J.-P., Pagès J.-M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance // *Clin Microbiol Rev*, 2019, Vol. 32(4). – P. 10.1128/cmr.00002-00019. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-19>

Ranjbar R., Farahani A. Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran // *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, Vol. 8(– P. 172. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0612-5>

Sinha S., Upadhyay L. S. B. Understanding antimicrobial resistance (AMR) mechanisms and advancements in AMR diagnostics // *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2025, Vol. 113(2). – P. 116949. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2025.116949>

Yan W. X., Hunnewell P., Alfonse L. E., Carte J. M., Keston-Smith E., Sothiselvam S., Garrity A. J., Chong S., Markarova K. S., Koonin E. V., Cheng D. R., Scott D. A. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems // *Science*, 2019, Vol. 363(6422). – P. 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.aav7271>

Li S. Y., Cheng Q. X., Liu J. K., Nie X. Q., Zhao G. P., Wang J. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA // *Cell Res*, 2018, Vol. 28(4). – P. 491-493. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0022-x>

Akimbekova A., Shaizadinova A., Amanzholova M., Bulashev A., Abeldenov S. Integrated RPA-CRISPR/Cas12a Technology for Rapid Detection of *Salmonella enterica* // *Diagnostics (Basel)*, 2026, Vol. 16(9). – P. <https://doi.org/10.3390/diagnostics16091371>

Zhang X., Duan M., Zhao Y., Zhang K., Liu F., Jie J., Li C., Chen D., Li D., Hua S., Wang C., Guan Q., Wu J., Liu B., Song L. Rapid and Specific Detection of *Acinetobacter baumannii* Infections Using a Recombinase Polymerase Amplification/Cas12a-based System // *J Vis Exp*, 2025, Vol. 218). – P. <https://doi.org/10.3791/67542>

Shin J., Kim S. R., Xie Z., Jin Y. S., Wang Y. C. A CRISPR/Cas12a-Based System for Sensitive Detection of Antimicrobial-Resistant Genes in Carbapenem-Resistant Enterobacteriales // *Biosensors (Basel)*, 2024, Vol. 14(4). – P. <https://doi.org/10.3390/bios14040194>

Zhao Z., Li Y., Xiu L., Wang F., Peng J. Development of a CRISPR/Cas-Based Detection Platform for Tracking Decreased Susceptibility to Cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* // *Anal Chem*, 2025, Vol. 97(36). – P. 19445-19455. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c01400>

Gao P., Shi S., Zhang D., Zhang Y. Rapid and visual RPA-CRISPR/Cas12a detection for *Staphylococcus pseudintermedius* and methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in clinical samples of dogs and cats // *One Health Advances*, 2023, Vol. 1(1). – P. 20. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00021-z>

UDC 577.21

RAPID DETECTION OF THE *blaTEM* GENE IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* USING RPA ISOTHERMAL AMPLIFICATION AND THE CRISPR/CAS12A SYSTEMMeruyert Amanzholova^{1,2}, Ainur Akimbekova¹, Aisha Shaizadinova¹, Nazgul Sutimbekova³, Nelya Bissenova⁴, Pavel Tarlykov¹, Sailau Abeldenov^{1*}¹ National Center for Biotechnology, 13/5 Kurgalzhynskoye road, Astana, 010000, Kazakhstan;² Farabi Kazakh National University, 71 Al-Farabi Avenue, Almaty, 050040, Kazakhstan;³ Astana Medical University, 33 Saryarka Avenue, Astana, 010000, Kazakhstan,⁴ National Scientific Medical Center, 42 Abylai Khan Avenue, Astana, 010000, Kazakhstan,

* Correspondence: abeldenov@biocenter.kz

ABSTRACT

Antibiotic resistance is one of the key problems of modern medicine, especially in relation to nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*, which has a high ability to accumulate drug resistance genes. One of the beta-lactam antibiotic resistance genes is *blaTEM*, which plays an important role in the formation of resistance in gram-negative microorganisms, including *Acinetobacter baumannii*. Standard molecular genetic methods for detecting antibiotic resistance genes, including PCR and real-time PCR, require the use of thermal cycling equipment. In this regard, the development of isothermal amplification methods with alternative methods of recording the result is of interest to laboratories with limited instrumentation. In this regard, the use of isothermal amplification methods in combination with CRISPR/Cas systems for sensitive detection of target genes is a promising direction. The purpose of this study was to develop and evaluate the sensitivity of a method for detecting the *blaTEM* gene based on recombinase polymerase amplification (RPA) in combination with the CRISPR/Cas12a system. The study showed that the RPA method provides specific amplification of the target gene with a detection limit of 10⁴ copies/reaction. The results obtained confirm the fundamental operability of the RPA-CRISPR/Cas12a system for detecting a fragment of the *blaTEM* gene and fluorescence registration of the amplification product.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *blaTEM*, antibiotic resistance, RPA, CRISPR/Cas12a, isothermal amplification, molecular diagnostics

УДК 577.21

РПА ИЗОТЕРМИЯЛЫҚ КҮШЕЙТУДІ ЖӘНЕ CRISPR/CAS12A ЖҮЙЕСІН ҚОЛДАНА ОТЫРЫП, *ACINETOBACTER BAUMANNII*-ДЕ *BLATEM* ГЕНІН ЖЫЛДАМ АНЫҚТАУАманжолова Меруерт^{1,2}, Акимбекова Айнура¹, Шайзадинова Айша¹, Сутимбекова Назгуль³, Бисенова Неля⁴, Тарлыков Павел¹, Абелденов Сайлау^{1,*}¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан;² Қазақ ұлттық университеті. әл-Фараби, Әл-Фараби даңғылы, 71 ғимарат, Алматы, 050040, Қазақстан;³ Астана медицина университеті, Сарыарқа даңғылы, 33, 010000, Астана, Қазақстан;⁴ Ұлттық ғылыми медициналық орталық, Абылай хан даңғылы, 42, 010000, Астана, Қазақстан;

* Корреспондент: abeldenov@biocenter.kz

АННОТАЦИЯ

Антибиотикке төзімділік қазіргі заманғы медицинаның негізгі мәселелерінің бірі болып табылады, әсіресе дәріге төзімділік гендерін жинақтау қабілеті жоғары *Acinetobacter baumannii* тудырған ауруханаішілік инфекцияларға қатысты. В-лактамы антибиотиктерге төзімділік гендерінің бірі-блатем, ол грам-теріс микроорганизмдерде, соның ішінде *Acinetobacter baumannii*-де төзімділікті қалыптастыруда маңызды рөл атқарады. Антибиотикке төзімділік гендерін анықтаудың стандартты молекулалық-генетикалық әдістері, соның ішінде нақты уақыттағы ПЦР және ПЦР термоциклді Жабдықты пайдалануды талап етеді. Осыған байланысты нәтижені тіркеудің балама әдістерімен күшейтудің изотермиялық әдістерін әзірлеу аспаптар базасы шектеулі зертханалар үшін қызығушылық тудырады. Осыған байланысты мақсатты гендерді сезімтал анықтау үшін CRISPR/Cas жүйелерімен бірге изотермиялық күшейту әдістерін қолдану перспективалы бағыт болып табылады. Бұл зерттеудің мақсаты CRISPR/Cas12a жүйесімен біріктірілген рекомбиназды полимеразды күшейту (RPA) негізінде *blaTEM* генін анықтау әдісінің сезімталдығын әзірлеу және бағалау болды. зерттеу барысында RPA әдісі 10⁴ дана/реакцияны анықтау шегі бар мақсатты геннің арнайы күшейтілуін қамтамасыз ететіні көрсетілген. Нәтижелер *blaTEM* генінің фрагментін анықтау және күшейту өнімін флуоресцентті тіркеу үшін RPA-CRISPR/cas12a жүйесінің негізгі өнімділігін растайды.

Түйін сөздер: *Acinetobacter baumannii*, *blaTEM*, антибиотикке төзімділік, RPA, CRISPR/Cas12a, изотермиялық күшейту, Молекулалық диагностика