

ПРИМЕНЕНИЕ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МТТ-ТЕСТА

© 2024 г. В. А. Мушенков^{а, *}, Д. А. Лукьянов^{а, b}, Н. Ф. Мещерякова^а,
В. И. Кукушкин^с, Е. Г. Завьялова^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bЦентр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт
науки и технологий, Москва, 121205 Россия

^сИнститут физики твердого тела им. Ю.А. Осипьяна Российской академии наук,
Московская область, Черноголовка, 142432 Россия

*e-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

В настоящее время при лечении инфекционных заболеваний часто применяют эмпирические схемы терапии, не основанные на данных о резистентности возбудителя. Одна из главных причин необоснованного назначения антибактериальных препаратов — отсутствие быстрых и в то же время универсальных методов определения антибиотикорезистентности патогена. Наиболее широко применяемые культуральные технологии, такие как метод микроразведений, требуют длительного времени для наращивания нужного количества бактериальных клеток. Менее времязатратные методы оценки резистентности (геномные или протеомные) базируются на определении специфических маркеров (генов устойчивости, сверхэкспрессии определенных белков и др.); при этом конкретный протокол чаще всего применим к узкому числу как штаммов микроорганизмов, так и антибиотиков. Ранее нами продемонстрирована возможность применения технологии спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света для количественного определения продукта жизнедеятельности бактериальных клеток в МТТ-тесте — формазана, — причем напрямую, в клеточной суспензии. Отсутствие стадии выделения формазана упрощает анализ и повышает его точность. Время проведения исследования не превышало 2 ч при сохранении универсальности самого МТТ-теста. К ограничениям разработанного протокола по КР-детекции результатов МТТ-теста следует отнести высокий порог чувствительности по концентрации бактериальных клеток — 10^7 КОЕ/мл, в связи с чем образцы с низким содержанием бактерий проходят предварительную стадию культивирования. Здесь мы предлагаем способ повышения чувствительности определения формазана за счет использования эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) на наночастицах золота. В результате проведенного исследования подобраны оптимальные условия проведения ГКР-спектроскопии формазана как в растворе, так и в суспензии клеток *Escherichia coli*. Усиление сигнала формазана за счет применения ГКР на наночастицах золота позволило снизить порог чувствительности по числу бактериальных клеток в образце не менее чем в 30 раз — до 3×10^5 КОЕ/мл. Такая чувствительность не предел возможности разработанного протокола ГКР — введение в эксперимент других типов наночастиц, например оптимизированных по форме, размеру, концентрации, может дать дополнительное усиление ГКР-сигнала.

Ключевые слова: МТТ-тест, формазан, комбинационное рассеяние света, гигантское комбинационное рассеяние, наночастицы золота, *Escherichia coli*, бактерии, антибиотикорезистентность

DOI: 10.31857/S0026898424060134, EDN: IAFGAM

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к противомикробным препаратам была отнесена Всемирной организацией здравоохранения к числу 10 главных проблем медицины еще в XX веке [1]. Устойчивые к препаратам инфекции стали причиной (прямой или косвенной) 4.95 млн. смертей в 2019 г. [2]. Если не будут приняты меры по сдерживанию распространения лекарственно устойчивых инфекций, они станут самой частой причиной смертности к 2050 году, вызывая более 10 млн. смертей ежегодно [3]. Устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам развивается очень быстро из-за широкого применения антибиотиков в различных сферах деятельности человека [4]. Практически ко всем используемым антибиотикам у бактерий развивается резистентность, в том числе и к недавно вошедшим в клиническую практику. Так, последний принципиально новый класс антибиотиков был открыт в 1986 г. — в результате выделения дактиномицина из почвенных микроорганизмов — и впоследствии одобрен для клинического использования [5].

Устойчивые к антибиотикам микроорганизмы вызывают тяжелые, трудноизлечимые заболевания, отличающиеся от чувствительных возбудителей более длительным течением и повышенной летальностью [6]. Наибольшую опасность представляют мультирезистентные бактерии, такие как метициллинрезистентный золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), смертность от которого достигает 38% [7, 8]. При лечении тяжелых бактериальных инфекций важно своевременно начать этиотропное лечение. В клинической практике часто применяют эмпирические схемы медикаментозной терапии, не основанные на данных о резистентности инфекционного агента. Эмпирические схемы позволяют быстро начать лечение, что важно при тяжелом течении заболевания [9], однако они часто оказываются неэффективными [10, 11] или приводят к ухудшению состояния пациента [12]. Одна из причин выбора

эмпирических методик терапии — длительность проведения анализов на антибиотикорезистентность. Для этого чаще всего используют культуральные методы [13] (диско-диффузионный, микроразведений, Е-тест, автоматизированные тест-системы), главное ограничение которых заключается в необходимости культивирования клинического бактериального изолята [14]. Есть более быстрые методы определения антибиотикорезистентности, в том числе основанные на идентификации генов устойчивости методом ПЦР (например, GeneXpert MTB/RIF — тест на устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину [15]). Однако ограничения есть и у этих методов. Так, протокол молекулярно-генетического анализа обычно предназначен для исследования конкретного микроорганизма или антибиотика и не подходит для других патогенов. Кроме того, идентифицированный ген антибиотикорезистентности может нести мутацию или быть функционально неактивным, что приведет к ложноположительному результату [14].

Оценка метаболической активности бактерий с использованием МТТ-теста. МТТ-тест основан на ферментативном восстановлении тетразолиевых солей, обычно 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолбромид (МТТ), до соответствующих формазановых красителей (рис. 1).

Восстановление МТТ катализируется NADH-зависимыми оксидоредуктазами, активность которых напрямую зависит от метаболизма клетки, поэтому по скорости реакции и количеству полученного формазана можно определить жизнеспособность исследуемых клеток. МТТ вводят в клеточную суспензию и через определенное время детектируют образовавшийся формазан спектрофотометрически, предварительно экстрагировав его органическими растворителями [16]. Наиболее широко МТТ-тест используют для оценки жизнеспособности эукариотических клеток [17], в том числе при исследовании цитотоксичности потенциальных лекарственных средств

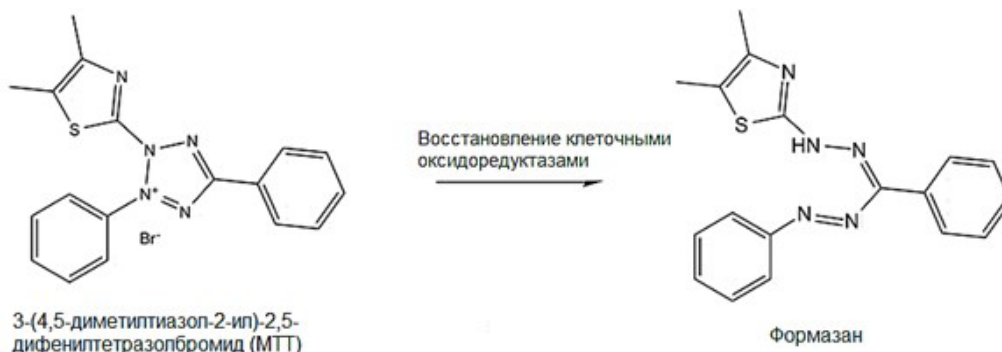


Рис. 1. Реакция восстановления МТТ.

[18, 19], пролиферативной активности клеток [20, 21], чувствительности злокачественных опухолей к химиопрепаратам [22, 23] и других. Несмотря на тот факт, что механизм восстановления тетразолов в клетках прокариот изучен плохо, в настоящее время МТТ-тест используют и для прокариот [24]: идентификации резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [25, 26], поиска соединений с антибактериальной активностью [27, 28], анализа биопленкообразования [29], антибактериальной активности нейтрофилов [30, 31].

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР; англ. эквивалент — Raman spectroscopy) — не разрушающий образцы, высокоспецифичный метод детекции соединений, основанный на неупругом (комбинационном) рассеянии света. Рассеянный таким образом свет отличается по энергии от изначального, величина сдвига дает информацию о колебательных модах в системе [32]. Рамановская спектроскопия позволяет получать “отпечатки пальцев”, уникальные для каждого соединения и отражающие его структуру. Именно поэтому спектроскопию КР широко используют для изучения структурных превращений биомолекул [33, 34], детекции онкомаркеров [35–37], идентификации микроорганизмов [38, 39]. Низкая интенсивность КР-света может служить ограничением метода там, где требуется высокая чувствительность.

Определение формазана в МТТ-тесте методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) вместо традиционного спектрофотометрического метода имеет ряд преимуществ. Так, высокая специфичность КР позволяет определять формазан непосредственно в образце и тем самым исключить стадию экстракции формазана органическими растворителями. Это упрощает процесс пробоподготовки и позволяет избежать осаждения белков органическими растворителями, что искажает оптические характеристики исследуемого образца [40]. Спектрофотометрический метод примерно на два порядка [41] менее чувствителен, чем спектроскопия ГКР, поэтому для образования достаточного для анализа количества формазана требуется длительная инкубация бактерий с МТТ, особенно в случае медленно растущих штаммов [24].

Интенсивность и число характеристических полос формазана и МТТ в спектрах ГКР зависят от выбора длины волны возбуждающего излучения. МТТ имеет наиболее интенсивный спектр при облучении коротковолновым синим (325 нм) лазером, тогда как для определения формазана оптимален красный (633 нм) лазер [41]. Вследствие того, что длина волны красного лазера близка к максимуму оптического поглощения формазана, возникает эффект резонансного КР, прояв-

ляющийся в увеличении интенсивности характеристических полос формазана и появлению дополнительных. В спектрах МТТ и формазана интенсивность полос со сдвигом 992 и 967 см^{-1} соответственно имеет линейную зависимость от концентрации (для формазана при облучении лазером с длиной волны 633 нм такую зависимость имеет также полоса 722 см^{-1}). Таким образом, эти полосы могут быть использованы для количественного определения этих двух соединений [42].

Определение антибиотикорезистентности. Ранее нами разработан быстрый метод определения антибиотикорезистентности на основе МТТ-теста для прокариот (см. “Экспериментальная часть”), который основан на изменении количества формазана, вырабатываемого бактериями, вследствие подавления их жизнедеятельности антибактериальными препаратами. Скорость изменения активности бактерий под действием антибиотиков достаточно высокая, поэтому достоверные различия в выработке формазана чувствительными и устойчивыми штаммами регистрируют в течение 30–60 мин после введения антибиотика. К преимуществам метода относятся небольшая длительность анализа (всего 1–2 ч) и универсальность (применим для широкого спектра бактерий и антибактериальных препаратов). Использование метода КР для определения формазана непосредственно в образце упрощает проведение анализа за счет снижения его стадийности и переноса оборудования и реактивов.

Ограничительный фактор — низкая чувствительность спектроскопии КР. Так, минимальная концентрация бактериальных клеток, при которой вырабатывается достаточное для измерения количество формазана, составляет 1×10^7 КОЕ/мл. Такого количества вполне достаточно для измерения подготовленных препаратов клеток (например, ночных культур), но не для клинических образцов. Так, в образцах мочи клинически значимая концентрация бактерий составляет в среднем 10^4 – 10^5 КОЕ/мл [43], а при инфекциях крови — 1–100 клеток/мл [44]. Таким образом, для определения антибиотикорезистентности бактерий в таких образцах необходимо либо вводить стадию культивирования, что усложняет анализ и увеличивает его длительность, либо повышать чувствительность детекции формазана.

Для повышения чувствительности КР-анализа применяют ГКР, или SERS (Surface-Enhanced Raman spectroscopy) [45]. Спектроскопия ГКР основана на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, возникающем на шероховатых металлических структурах, в качестве которых часто используются наночастицы серебра или золота. Эффект ГКР проявляется на небольшом расстоянии от поверхности [46], однако обладает очень

большим (до 10^{14}) фактором усиления, позволяя детектировать в отдельных случаях единичные молекулы [47]. В работах Z. Мао с соавт. [41, 42] описана методика определения формазана, образуемого в эукариотическом МТТ-тесте, с использованием в качестве субстрата ГКР наночастиц золота, синтезированных из тетрахлорауроной кислоты и цитрата натрия. Эти наночастицы эффективно усиливали сигнал формазана при облучении красным светом, то есть при анализе его спектра также регистрировали эффект резонансного КР, дополнительно увеличивающий чувствительность детектора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Тетразолиевый краситель МТТ (“ДИА-М”, Россия) разводили до концентрации 4 мг/мл в воде и хранили при 4°C . Состав PBS (pH 7.2): 0.8% NaCl, 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% KCl, 0.12% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Стерильную жидкую форму среды LB (“Condalab”, Италия) готовили по протоколу, рекомендованному производителем: 4 г сухой смеси LB растворяли в 200 мл воды и автоклавировали 15 мин при 121°C .

Инструменты, параметры измерения. Для получения спектров КР и ГКР использовали спектрометр Фотон-Био RL638 (“Фотон-Био”, Россия) с длиной волны лазера 638 нм и мощностью излучения 100 мВт. Параметры измерения: экспозиция 1000 мс, 10 повторов, мощность лазера (ШИМ) 70%. Измерения проводили в кюветах с рабочим объемом 500 мкл. Спектры обрабатывали скриптом на Python3 алгоритмами Уиттакера [48] и асимметричного взвешенного сглаживания по методу наименьших квадратов [49].

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ЭКРОС 5400УФ (“Экрос”, Россия).

Получение наночастиц золота. Наночастицы золота получали по методике G. Frens [50]. К 30 мл воды добавляли 347.6 мкл 25.4 mM HAuCl_4 , нагревали до кипения, вносили 126 мкл 1%-ного водного раствора цитрата натрия и кипятили смесь еще 40 мин. Получали раствор бордового цвета (pH 6.0), содержащий наночастицы золота диаметром 45–50 нм (оптимальный размер для ГКР-спектроскопии [51]). Спектр поглощения раствора наночастиц после синтеза представлен на рис. S1 (см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Mushenkov_rus.pdf).

МТТ-тест и пробоподготовка формазана для ГКР-анализа. Ночную культуру клеток *Escherichia coli*, штамм d1 (1 мл), обрабатывали 200 мкл рас-

твора МТТ и инкубировали 1 ч при 37°C , после чего клеточную суспензию центрифугировали при 12400 g в течение 1 мин. К осадку добавляли 2 мл изопропилового спирта, тщательно перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. Супернатант отбирали и разбавляли в два раза изопропанолом. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм и доводили до 4 о.е. (соответствует концентрации формазана 0.13 г/л) [52].

Подготовка культуры клеток для ГКР-анализа. Ночные культуры бактерий *E. coli* JW5503 Δ tolC [53] растили в течении 8 ч в инкубаторе при 37°C , после чего разбавлялись средой LB до конечной концентрации 6×10^8 КОЕ/мл ($\text{OD}_{600} = 0.451$) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C .

Определения антибиотикорезистентности бактериальных штаммов и минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Этот протокол включал несколько этапов.

1. Исследуемые штаммы бактерий (концентрация 2 по МакФарланду) разбавляли свежей средой LB и инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

2. Пятьдесят микролитров клеточной суспензии вносили в кювету с фосфатным буфером (PBS), содержащим антибиотик (конечный объем реакционной смеси — 400 мкл), и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Использовали увеличивающиеся концентрации антибиотика и отрицательный контроль (PBS без антибиотика).

3. После инкубации добавляли 100 мкл МТТ (4 мкг/мл), инкубировали 20 мин и измеряли интенсивность пика 967 см^{-1} (формазан) на КР-спектрометре. Интенсивность этого пика для контрольного образца (без антибиотика) принимали за 100%; значения, полученные для опытных образцов, нормировали по контролю. Концентрация антибиотика, при которой интенсивность сигнала формазана резко снижалась (до 40–60% от контроля), принимали за минимальную концентрацию ингибирования (МИК) данного антибиотика. Подробное описание метода приведено в патентной заявке № 2023129249 от 13.11.2023.

КР- и ГКР-анализ спектра формазана в культуре клеток. Для получения спектров КР использовали вышеприведенную методику. К 50 мкл культуры бактериальных клеток добавляли 350 мкл PBS, 100 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 20 мин. Смесь переносили в кювету и регистрировали КР-спектр.

Для анализа спектра ГКР отбирали 200 мкл клеточной суспензии, добавляли 100 мкл изопропилового спирта и перемешивали, после чего вносили 300 мкл суспензии наночастиц золота,

инкубировали 5 мин при комнатной температуре и регистрировали ГКР-спектр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий ГКР-спектроскопии для регистрации формазана

Для определения оптимальных условий регистрации ГКР-спектра формазана варьировали концентрацию наночастиц и время инкубации и выбирали такие, при которых усиление сигнала было максимальным.

Различные объемы (от 0 до 400 мкл) наночастиц золота вносили в раствор формазана (5 мкл с концентрацией 0.13 г/л) в рассчитанном объеме PBS — таком, чтобы конечный объем смеси

составлял 500 мкл. После 3 мин инкубации регистрировали спектр ГКР и оценивали интенсивность полос 722 и 967 см^{-1} . Максимальное усиление сигнала детектировали для образца, содержащего 300 мкл наночастиц, при дальнейшем увеличении их концентрации интенсивность сигнала снижалась (рис. 2).

В связи с тем, что интенсивность ГКР-спектра зависела и от времени инкубации формазана с наночастицами золота, мы проанализировали и этот параметр. Для этого подготовили ряд образцов, добавляя к 5 мкл раствора формазана (0.13 г/л) в 195 мкл фосфатного буфера 300 мкл наночастиц. Образцы инкубировали в течение различных промежутков времени, отбирая аликваты с шагом в 1 мин, и регистрировали спектры ГКР. Как видно на рис. 3, интенсивность сигнала быстрее всего нарастала в течение первых 3 мин, в интервале 3–7

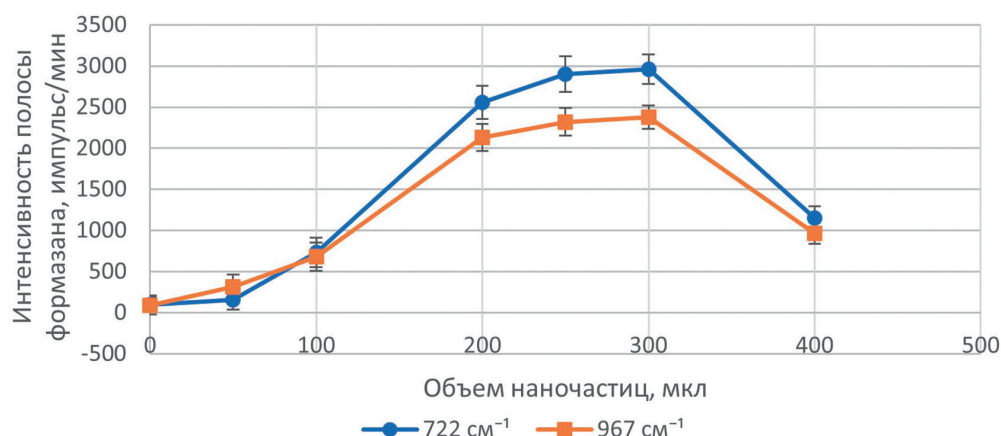


Рис. 2. Подбор концентрации наночастиц золота для усиления сигнала формазана в ГКР-спектре.

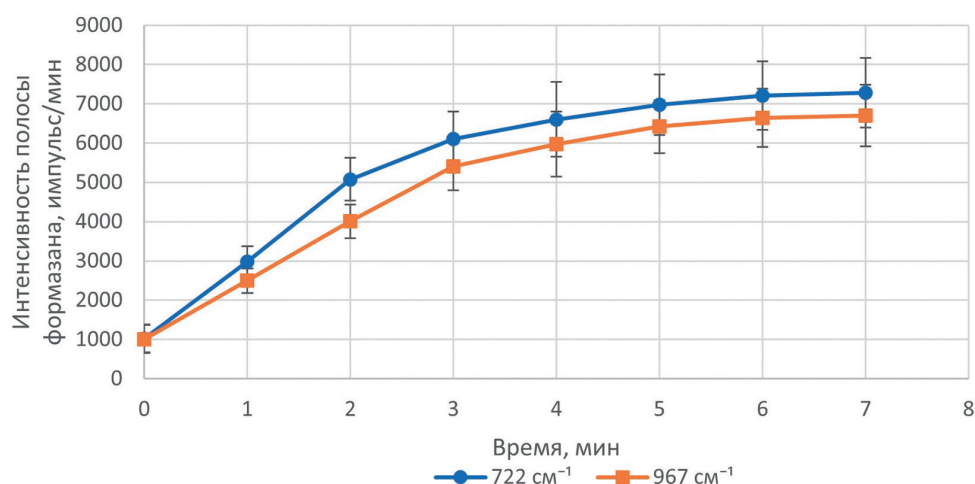


Рис. 3. Подбор времени инкубации формазана с наночастицами золота для усиления сигнала в ГКР-спектре.

мин скорость роста постепенно замедлялась, а при длительной инкубации, 20–30 мин, снижалась из-за агрегации наночастиц (*результаты не представлены*). Для дальнейших экспериментов по анализу жизнеспособности бактериальных клеток был выбран 5-минутный период инкубации исследуемых образцов с наночастицами.

Оптимальное разрешение полос получено в следующих условиях пробоподготовки: 5 мкл (0.13 г/л) раствора формазана в 195 мкл PBS в присутствии 300 мкл суспензии наночастиц, время инкубации – 5 мин. Полученный спектр имел интенсивные характеристические полосы формазана, отмеченные на рис. 4.

Сравнение чувствительности спектроскопии ГКР и КР для формазана

Эффект ГКР был оценен прямым сравнением интенсивности спектра формазана в присутствии золотых наночастиц и без них. Для этого к различным объемам формазана добавляли PBS до объема 200 мкл, затем 300 мкл наночастиц (в случае ГКР) или 300 мкл PBS (в случае КР). Спектры были сняты после инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре. На рис. 5 приведено сравнение интенсивностей полосы 967 см^{-1} .

Для ГКР-спектра наиболее выраженное, приблизительно 50-кратное, усиление сигнала регистрировали в области низких концентраций формазана (до 2 мкг/мл); при повышении кон-

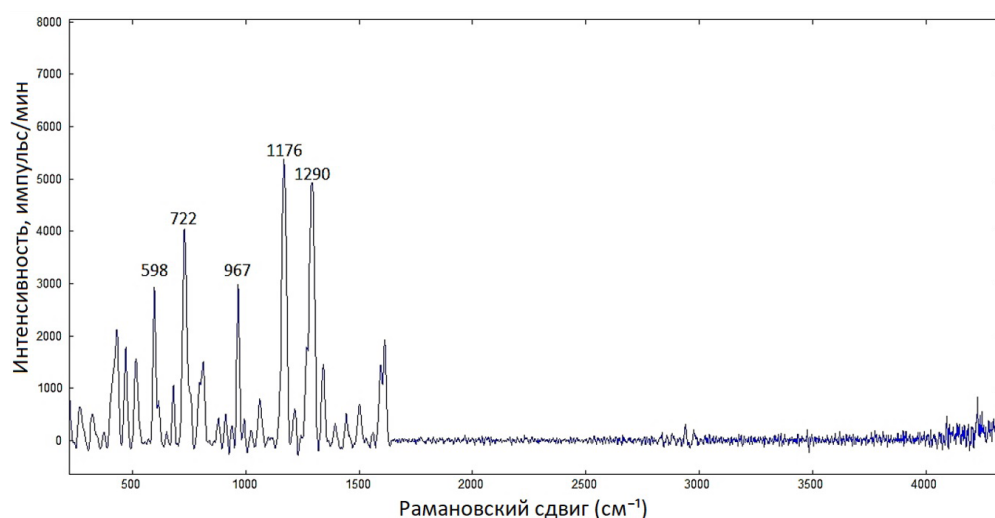


Рис. 4. ГКР-спектр формазана (концентрация 1.25 мкг/мл). Характеристические пики формазана подписаны; длина волны возбуждающего излучения – 638 нм.

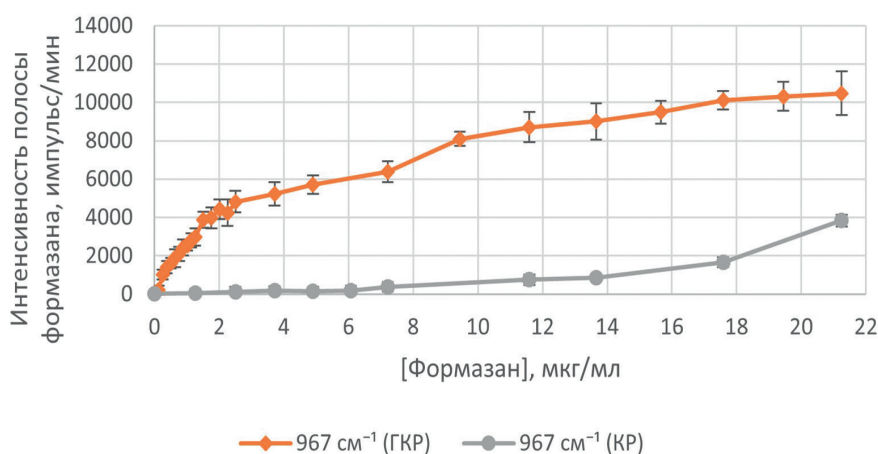


Рис. 5. Сравнительный анализ ГКР- и КР-спектров формазана.

Таблица 1. Сравнение интенсивности пика формазана при 967 см^{-1} в спектрах КР и ГКР

Метод	[Формазан], мкг/мл			
	при интенсивности сигнала, импульс/мин			
	500	1 000	2 000	4 000
КР	11.00	14.50	17.50	21.00
ГКР	0.17	0.25	0.38	1.20
Усиление (КР/ГКР)	65	58	46	17

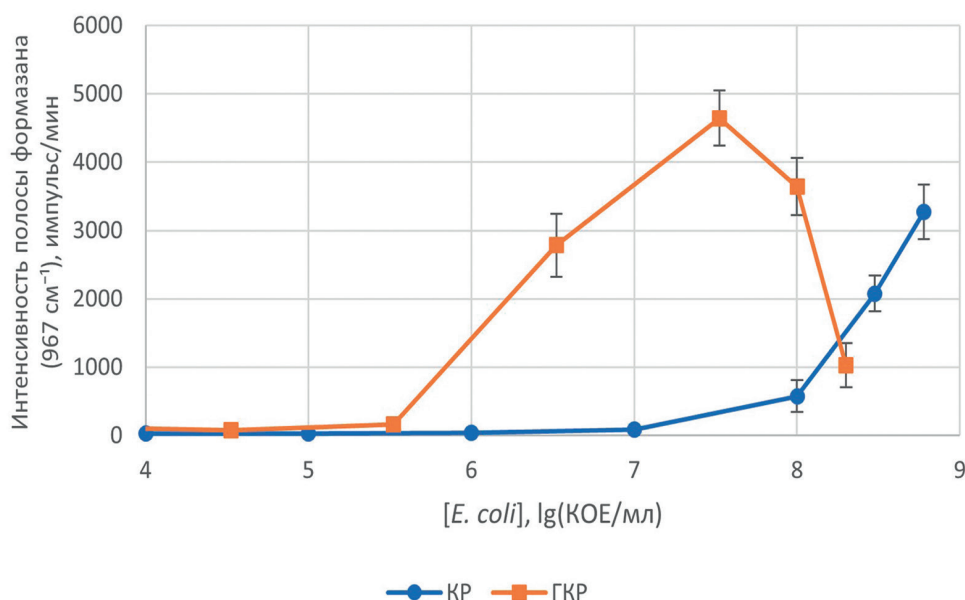
центрации интенсивность усиления снижалась, но оставалась на уровне, значимо превышающем сигнал КР-спектра. В случае ГКР предел обнаружения формазана составил 0.1 мкг/мл, в то время как для спектроскопии без усиления – 7 мкг/мл, то есть в 70 раз больше (табл. 1).

Измерение ГКР-спектра бактерий

В отличие от раствора формазана, при добавлении наночастиц к образцам бактерий, обработанных МТТ, усиления сигнала за счет ГКР практически не было. Дело в том, что эффективность ГКР быстро падает с увеличением расстояния от рассеивающей свет молекулы до поверхности наночастицы [54]. Добавляемый в ходе МТТ-теста тетразол восстанавливается внутри клеток и образующийся формазан накапливается внутри них (наружу формазан выходит лишь при высокой

концентрации – когда формируемые им игольчатые кристаллы разрушают клетки) [55], поэтому наночастицы, находящиеся вне клеток, не могут оказаться достаточно близко к формазану для формирования ГКР-сигнала. Следовательно, для измерения спектра ГКР формазана в бактериях их необходимо предварительно лизировать – чтобы формазан вышел наружу и смог контактировать с поверхностью наночастиц. Ранее для эукариотических клеток было предложено использовать классическую методику проведения МТТ-теста, но без стадии выделения формазана. Так, к образцам после инкубации с МТТ добавляли ДМСО и непосредственно после добавления наночастиц проводили измерения [41].

Нами предложена модификация методики МТТ-теста с целью получения ГКР-спектра формазана в прокариотических клетках. Для лизиса


Рис. 6. Сравнение чувствительности ГКР- и КР-спектроскопии для определения концентрации формазана, образовавшегося из МТТ в жизнеспособных клетках *E. coli*.

клеток *E. coli* был выбран изопропиловый спирт и подобран его оптимальный объем, соответствующий максимальному усилению интенсивности сигнала формазана. Изопропиловый спирт эффективно высвобождал формазан из клеток *E. coli*, при этом не влиял на свойства наночастиц и не искажал спектр формазана (рис. S1—S4, табл. S1; см. электронное приложение). Результаты сравнения спектров формазана, полученных ГКР- и КР-спектроскопией, приведены на рис. 6.

В результате проведенного анализа выявлено, что пороговое значение концентрации клеток *E. coli* в МТТ-тесте составило 3×10^5 КОЕ/мл в случае ГКР-спектроскопии и 1×10^7 КОЕ/мл для КР. Таким образом, благодаря применению наночастиц золота нам удалось снизить минимальную концентрацию анализируемых клеток в 30 раз. Интенсивность сигнала формазана в ГКР-спектре достигла максимума при концентрации бактериальных клеток 3×10^7 КОЕ/мл и резко снижалась при дальнейшем увеличении концентрации клеток, что сопровождалось агрегацией наночастиц и обесцвечиванием раствора.

Таким образом, нами была рассмотрена возможность повышения чувствительности определения формазана, образующегося в МТТ-тесте, при помощи ГКР-активных наночастиц золота. По сравнению с КР-спектроскопией ГКР на наночастицах золота имеет существенно более низкий предел обнаружения формазана и позволяет снизить минимальную концентрацию клеток *E. coli* до 3×10^5 КОЕ/мл в МТТ-тесте. Это значит, что теперь МТТ-тест можно использовать для анализа жизнеспособности образцов с низким содержанием бактериальных клеток — без предварительного их накопления культивированием.

Дальнейшее повышение чувствительности определения формазана — продукта жизнедеятельности клеток в МТТ-тесте — возможно за счет модификации поверхности наночастиц или изменения их формы/размера. Применение ГКР-спектроскопии для детекции результатов МТТ-теста при анализе антибиотикорезистентности бактерий позволит быстро и точно определять этот параметр и оперативно разрабатывать персонализированную схему лечения инфекционных заболеваний.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-65-00015, <https://rscf.ru/project/24-65-00015/>).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh T.R., Gales A.C., Laxminarayan R., Dodd P.C. (2023) Antimicrobial resistance: addressing a global threat to humanity. *PLoS Med.* **20**(7), e1004264.
- Ranjbar R., Alam M. (2024) Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). (2023) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Evid. Based Nurs.* **2023**, ebnurs-2022–103540. <https://doi.org/10.1136/ebnurs-2022-103540>
- O'Neill J. (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. <https://apo.org.au/node/63983>
- Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S., Levin S.A., Goossens H., Laxminarayan R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**(15), E3463–E3470.
- Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. (2019) Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **53**(4), 371–382.
- de Kraker M.E.A., Lipsitch M. (2021) Burden of antimicrobial resistance: compared to what? *Epidemiol. Rev.* **43**(1), 53–64.
- Hanberger H., Walther S., Leone M., Barie P.S., Rello J., Lipman J., Marshall J.C., Anzueto A., Sakr Y., Pickkers P. (2011) Increased mortality associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the Intensive Care Unit: results from the EPIC II study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **38**(4), 331–335.
- Yang C.C., Sy C.L., Huang Y.C., Shie S.S., Shu J.C., Hsieh P.H., Hsiao C.H., Chen C.J. (2018) Risk factors of treatment failure and 30-day mortality in patients with bacteremia due to MRSA with reduced vancomycin susceptibility. *Sci. Rep.* **8**(1), 7868.
- Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M., Bion J., Parker M.M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D.C., Brun-Buisson C., Beale R. (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.* **36**(1), 296–327.
- Chen H.C., Lin W.L., Lin C.C., Hsieh W.H., Hsieh C.H., Wu M.H., Wu J.Y., Lee C.C. (2013) Outcome of inadequate empirical antibiotic therapy in emergency department patients with community-onset bloodstream infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**(4), 947–953.
- Dickinson J.D., Kollef M.H. (2011) Early and adequate antibiotic therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **13**, 399–405.
- Goneau L.W., Delport J., Langlois L., Poutanen S.M., Razvi H., Reid G., Burton J.P. (2020) Issues beyond resistance: inadequate antibiotic therapy and bacterial hypervirulence. *FEMS Microbes.* **1**(1), xtaa004.
- Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* **49**(11), 1749–1755.

14. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. (2019) Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics* (Basel). **9**(2), 49.
15. Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J., Pai M., Boehme C.C., Dendukuri N. (2014) Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**(1), CD009593.
16. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. (2018) Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**(6), pdb-prot095505.
17. Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 237–245.
18. Bahuguna A., Khan I., Bajpai V.K., Kang S.C. (2017) MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangl. J. Pharm.* **12**(2), 115–118.
19. Tolosa L., Donato M. T., Gómez-Lechón M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 333–348.
20. Weichert H., Blechschmidt I., Schröder S., Ambrosius H. (1991) The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg. Immunol.* (Leipz). **37**(3–4), 139–144.
21. Molaee N., Mosayebi G., Pishdadian A., Ejtehadifar M., Ganji A. (2017) Evaluating the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells using MTT assay. *Int. J. Basic Sci. Med.* **2**(1), 25–28.
22. Cole S.P.C. (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17**(3), 259–263.
23. Campling B.G., Pym J., Baker H.M., Cole S.P.C., Lam Y.M. (1991) Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br. J. Cancer.* **63**(1), 75–83.
24. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. (2018) Current methodology of MTT assay in bacteria — a review. *Acta Histochem.* **120**(4), 303–311.
25. Montoro E., Lemus D., Echemendia M., Martin A., Portals F., Palomino J.C. (2005) Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**(4), 500–505.
26. Mshana R.N., Tadesse G., Abate G., Miörner H. (1998) Use of 3–(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **36**(5), 1214–1219.
27. Moodley S., Koorbanally N.A., Moodley T., Ramjugernath D., Pillay M. (2014) The 3–(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, -5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the *in vitro* anti-tuberculous activity of chalcones. *J. Microbiol. Methods.* **104**, 72–78.
28. Shi L., Ge H.M., Tan S.H., Li H.Q., Song Y.C., Zhu H.L., Tan R.X. (2007) Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *Eur. J. Med. Chem.* **42**(4), 558–564.
29. Brambilla E., Ionescu A., Cazzaniga G., Edefonti V., Gagliani M. (2014) The influence of antibacterial toothpastes on *in vitro* *Streptococcus mutans* biofilm formation: a continuous culture study. *Am. J. Dent.* **27**(3), 160–166.
30. Stevens M.G., Olsen S.C. (1993) Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J. Immunol. Methods.* **157**(1–2), 225–231.
31. Stevens M.G., Kehrli Jr M.E., Canning P.C. (1991) A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **28**(1), 45–56.
32. Kudelski A. (2008) Analytical applications of Raman spectroscopy. *Talanta.* **76**(1), 1–8.
33. Kuhar N., Sil S., Umapathy S. (2021) Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **258**, 119712.
34. Martinez M.G., Bullock A.J., MacNeil S., Rehman I.U. (2019) Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **54**(6), 509–542.
35. Beljebbar A., Bouché O., Diébold M.D., Guillou P.J., Palot J.P., Eudes D., Manfait M. (2009) Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **72**(3), 255–264.
36. Depciuch J., Kaznowska E., Zawlik I., Wojnarowska R., Cholewa M., Heraud P., Cebulski J. (2016) Application of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer. *Appl. Spectrosc.* **70**(2), 251–263.
37. Chan J.W., Taylor D.S., Lane S.M., Zwerdling T., Tuscano J., Huser T. (2008) Nondestructive identification of individual leukemia cells by laser trapping Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **80**(6), 2180–2187.
38. Pahlow S., Meisel S., Cialla-May D., Weber K., Rösch P., Popp J. (2015) Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **89**, 105–120.
39. Stöckel S., Kirchhoff J., Neugebauer U., Rösch P., Popp J. (2016) The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *J. Raman. Spectrosc.* **47**(1), 89–109.
40. Riss T. (2017) Is your MTT assay really the best choice? Promega Corporation website <http://www.promega.in/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/>
41. Mao Z., Liu Z., Chen L., Yang J., Zhao B., Jung Y.M., Wang X., Zhao C. (2013) Predictive value of the surface-enhanced resonance Raman scattering-based MTT assay: a rapid and ultrasensitive method for cell viability *in situ*. *Anal. Chem.* **85**(15), 7361–7368.
42. Mao Z., Liu Z., Yang J., Han X., Zhao B., Zhao C. (2018). *In situ* semi-quantitative assessment of single-cell viability by resonance Raman spectroscopy. *Chem. Commun. (Camb.)*. **54**(52), 7135–7138.

43. Wilson M.L., Gaido L. (2004) Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin. Infect. Dis.* **38**(8), 1150–1158.
44. Lamy B., Dargère S., Arendrup M.C., Parienti J.J., Tattevin P. (2016) How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Front. Microbiol.* **7**, 191111.
45. Stiles P.L., Dieringer J.A., Shah N.C., Van Duyne R.P. (2008) Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 601–626.
46. Bell S.E.J., Charron G., Cortés E., Kneipp J., de la Chapelle M.L., Langer J., Procházka M., Tran V., Schlücker S. (2020) Towards reliable and quantitative surface-enhanced Raman scattering (SERS): from key parameters to good analytical practice. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **59**(14), 5454–5462.
47. Lin C., Li Y., Peng Y., Zhao S., Xu M., Zhang L., Huang Z., Shi J., Yang Y. (2023) Recent development of surface-enhanced Raman scattering for biosensing. *J. Nanobiotechnology.* **21**(1), 149.
48. Eilers P.H.C. (2003) A perfect smoother. *Anal. Chem.* **75**(14), 3631–3636.
49. Baek S.J., Park A., Ahn Y.J., Choo J. (2015) Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing. *Analyst.* **140**(1), 250–257.
50. Frens G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **241**(105), 20–22.
51. Hong S., Li X. (2013) Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. *J. Nanomater.* **2013**(1), 790323.
52. Gerlier D., Thomasset N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods.* **94**(1–2), 57–63.
53. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**(1), 2006–2008.
54. Kumari G., Kandula J., Narayana C. (2015) How far can we probe by SERS? *J. Phys. Chem. C.* **119**(34), 20057–20064.
55. Xu W., Shi D., Chen K., Palmer J., Popovich D.G. (2023) An improved MTT colorimetric method for rapid viable bacteria counting. *J. Microbiol. Methods.* **214**, 106830.

Surface-Enhanced Raman Scattering to Improve the Sensitivity of the MTT-Test

B. A. Mushenkov^{1, *}, D. A. Lukyanov^{1, 2}, N. F. Meshcheryakova¹,
V. I. Kukushkin³, E. G. Zavyalova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Center of Molecular and Cell Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

³Yu.A. Osipyan Institute of Solid State Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

*e-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Currently, empirical therapy regimens are often used in the treatment of infectious diseases that are not based on data on pathogen resistance. One of the main reasons for the unjustified prescription of antibacterial drugs is the lack of rapid and at the same time universal methods of determining antibiotic resistance of the pathogen. The most widely used culture techniques, such as the microdilution method, require a long time to generate the necessary number of bacterial cells. Less time-consuming methods of resistance assessment (genomic or proteomic) are based on the determination of specific markers (resistance genes, overexpression of certain proteins, etc.); in this case, the specific protocol is most often applicable to a narrow number of both microorganism strains and antibiotics. Previously, we have demonstrated the possibility of using Raman spectroscopy (RS) technology for quantitative determination of the product of bacterial cell activity in the MTT assay, formazan, directly in the cell suspension. The absence of the formazan isolation step simplifies the assay and increases its accuracy. The analysis time did not exceed 2 h while maintaining the versatility of the MTT assay itself. Limitations of the developed protocol for RS detection of MTT assay results include a high sensitivity threshold of 10^7 CFU/mL for bacterial cell concentration, so a preliminary stage of cultivation is necessary for samples with low bacterial content. Here, we propose a method to increase the sensitivity of formazan determination by utilizing the effect of surface-enhanced Raman scattering (SERS) on gold nanoparticles. As a result of the study, the optimal conditions for SERS analysis of formazan in both solution and suspension of *Escherichia coli* cells are selected. Formazan signal amplification due to the use of SERS on gold nanoparticles instead of RS allowed us to reduce the sensitivity threshold for the number of bacterial cells in the sample at least 30 times, up to 3×10^5 CFU/mL. This sensitivity is not the limit of the SERS technology capabilities because of the introduction of other types of nanoparticles (more optimal in shape, size, concentration, etc.) into the experiment will allow to achieve even higher signal amplification.

Keywords: MTT assay, formazan, Raman scattering, surface-enhanced Raman scattering, *Escherichia coli*, bacteria, antibiotic resistance