

# МЕТОДЫ БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

© 2025 г. Н. Г. ЯББАРОВ\*, Е. Д. НИКОЛЬСКАЯ\*, С. Б. БИБИКОВ,  
А. А. МАЛЬЦЕВ, М. В. ЧИРКИНА, М. Р. МОЛЛАЕВА, М. Б. СОКОЛ,  
Е. Ю. ЭПОВА, Р. О. АЛИЕВ, И. Н. КУРОЧКИН

*Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

I. Введение II. Влияние антибиотиков на продукцию активных форм кислорода и использование этого фактора для разработки быстрых методов тестирования антибиотикорезистентности. III. Применение импедансометрии для идентификации бактерий и определения их устойчивости к антибиотикам. IV. Спектроскопия комбинационного рассеяния и её модификации для определения резистентных штаммов бактерий. V. Масс-спектрометрия в идентификации бактериальных изолятов и анализа резистентности. VI. Микроскопия. VII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий наблюдается увеличение распространенности бактериальных инфекций, что связано с возникновением устойчивости к применяемым антибиотикам, и является одной из наиболее острых глобальных угроз [1].

Снижение числа новых антибиотиков на рынке на фоне роста числа резистентных штаммов микроорганизмов вызывает серьёзные опасения. В Европейском Союзе ежегодно регистрируется около 33 000 смертей, связанных с резистентными бактериальными инфекциями, а в США эта цифра составляет приблизительно 35 000 случаев [2]. Наиболее опасные инфекции в США вызываются *Enterococcus faecium*, метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridioides difficile* и *Escherichia coli*, продуцирующей β-лактамазы расширенного спектра [3]. Некорректное назначение антибиотиков в значительной мере усугубляет проблему антибиотикорезистентности, так по различным оценкам, более 50% антибиотиков, назначаемых во всем мире, используются либо без необходимости (например, при вирусных инфекциях), либо неправильно (например, выбор

---

*Список сокращений:* ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; КОЕ – колониеобразующая единица; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МС – масс-спектрометрия; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РНК – рибонуклеиновая кислота; AST – анализ чувствительности к антибиотикам; ATCC – американская коллекция типовых культур; CLSI – институт клинических и лабораторных стандартов; EUCAST – европейский комитет по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам; FAD – флавинадениндинуклеотид.

*Адрес для корреспонденции:* elenanikolskaja@gmail.com (Никольская Елена Дмитриевна); yabbarovng@gmail.com (Яббаров Никита Григорьевич).

неподходящего антибиотика узкого спектра действия или назначение антибиотиков широкого спектра действия без обоснования) [3], что способствует росту антибиотикорезистентных штаммов, которые обычно подавляются нормальной микробиотой человека [4]. Особую озабоченность вызывает распространение бактерий, обладающих множественной или пан-резистентностью к антибиотикам [5, 6]. При сохранении текущей динамики заболеваемости и применения антибиотиков, к 2050 году это может привести к 10 миллионам смертей ежегодно и экономическому ущербу в размере около 100 триллионов долларов США [7, 8].

В настоящее время для оценки AST (antibiotic susceptibility testing) применяются два основных подхода: генотипический и фенотипический. Выявление генов, связанных с резистентностью, представляет собой важный аспект в решении проблемы антибиотикостойчивости [9, 10]. В основе генотипических методов лежит выявление генов резистентности и определение видоспецифичных консервативных последовательностей рРНК с использованием таких техник, как ПЦР [11, 12], полногеномное секвенирование [13, 14], различные виды амплификаций (например, использование padlock зондов) [15], молекулярная гибридизация и другие. Современные протоколы подобных анализов обладают рядом значительных преимуществ: не требуется предварительной обработки образцов; постановка анализа занимает мало времени (в некоторых случаях менее часа); возможно выявление широко спектра клинически-значимых генов. Некоторые подобные техники уже интегрированы в медицинские учреждения, например системы FilmArray (BioFire) или GeneXpert (Cepheid). Предполагается, что с развитием подобных подходов точность и полнота диагностики, основанной на данных секвенирования, амплификации или гибридизации для идентификации бактерий и определения AST, значительно возрастет [16, 17]. Важной особенностью методов генотипирования при анализе AST у вновь выявленных клинических изолятов бактерий является возможность наблюдения за нуклеотидным составом детерминант устойчивости, что имеет существенное значение для решения задач в области эпидемиологии и предсказания путей распространения антибиотикорезистентных штаммов или отдельных детерминант за счет горизонтального переноса в популяциях микроорганизмов [18]. Однако, недостатком метода генотипирования для практического применения в клинической диагностике является то, что наличие генетических маркеров не всегда позволяет предсказать количественные характеристики устойчивости конкретного штамма к антибиотикам, то есть, назначить оптимальные дозы антибиотиков для лечения конкретного больного [19]. Наиболее существенным фактором при этом является синергизм между несколькими детерминантами, который может делать неэффективными стандартные дозы антибиотиков, рекомендованные для лечения тех или иных инфекционных заболеваний.

Мутации в генах резистентности или неполное покрытие могут приводить к ложным результатам. Горизонтальный перенос генов резистентности и присутствие смешанных популяций микроорганизмов также влияют на достоверность результата [20, 21]. Эти проблемы особенно актуальны в условиях клинической диагностики *in vitro*, где надежность и точность имеют решающее значение. В силу чего приоритетной является разработка методов, коррелирующих с фенотипом микроорганизмов [22].

Методы определения AST, основанные на бактериологическом высеве с последующим подсчетом числа колоний или определением оптической плотности культуры, считаются золотым стандартом в клинической практике, поскольку результатом является

рост бактерий в присутствии антибиотиков. Общепринятая фенотипическая оценка AST (микроразведение и диск-диффузионные методы) требует визуальной оценки роста бактерий в течение 18–24 часов и более, что неприемлемо в оперативных случаях, требующих неотложного лечения [23]. В связи с чем имеется необходимость в разработке более быстрых, точных и простых систем идентификации бактерий и анализа их AST.

Для решения этих проблем были предложены различные методы анализа фенотипов микроорганизмов в присутствии и отсутствии антибиотиков [24–26]. Эти методы включают визуализацию ранних циклов деления и выявление метаболических изменений с использованием различных аналитических подходов: оптическая микроскопия, *in silico* анализ изображений, масс-спектрометрия, электрохимия, спектроскопия комбинационного рассеяния, анализ маркеров окислительного стресса и другие [27]. В комбинации с 3D печатью, микрофлюидными технологиями и проточной цитофлуориметрией, они имеют значительный потенциал. Целью данной работы является обзор наиболее актуальных методов и отдельных протоколов в оперативном анализе AST и МИК, их применимость в идентификации бактерий, необходимость культивирования образцов перед анализом или отсутствие таковой, а также применимость метода для анализа чистых изолятов и смешанных культур, что особенно актуально в условиях растущего числа инфекций с множественной и пан-лекарственной устойчивостью.

Необходимо отметить, что рассматриваемые ниже методы анализа AST на основании фенотипа (физиологической реакции) с применением различных физических методов существенно отличаются по степени новизны и известности для широкой аудитории. Так, методы, основанные на оценке продукции активных форм кислорода, восстановлении резазурина и производных тетразолия компонентами дыхательной цепи бактерий давно и прочно заняли свое место в диагностической практике работы лечебных учреждений. Методы, основанные на выявлении нарушения целостности плазматической мембраны бактерий под действием антибиотиков с применением проточной цитофлуориметрии широко применяются преимущественно в работе с возбудителями туберкулеза, что обусловлено медленным ростом *M. tuberculosis*, затрудняющим применением к нему классических бактериологических методов. Прочие методы: исследование аутофлуоресценции NADH, импедансометрия, оценка измерений метаболического фут-принта бактерий с помощью гигантского комбинационного рассеяния, применение масс-спектрометрии для наблюдения за метаболизацией антибиотика культурой и анализ изменения морфологической структуры бактерий под действием антибиотика с применением автоматического анализа изображений остаются новыми методами, находящимися на стадии лабораторных разработок.

В связи с вышеизложенным, целью данного обзора является анализ современного состояния в науке в области создания новых методов оценки AST. При этом акцент делается на перспективность изложенных методов с точки зрения ускорения анализа при проведении клинической диагностики, широте применимости спектра анализируемых патогенов, достоверности получаемых данных (сходимости их результатов с данными, получаемыми с помощью классических бактериологических процедур). Важным аспектом является также необходимость предварительной оценки таксономической принадлежности патогена до начала определения наличия/отсутствия AST.

## II. ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТОГО ФАКТОРА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЫСТРЫХ МЕТОДОВ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Сегодня, одной из наиболее популярных групп подходов для оценки метаболических свойств бактерий являются индикаторы на основе флуоресцентных красителей, ввиду чувствительности, дешевизны и простоты постановки анализа.

Так, в работе [28] исследовалось действие антибиотиков доксициклина (ингибитор трансляции) и ампициллина (ингибитор синтеза пептидогликана) на синтез активных форм кислорода (АФК) *Lactobacillus plantarum*, а также влияние на этот процесс производных пуриновых нуклеотидов. Было установлено, что оба антибиотика существенно подавляют работу генов, участвующих в метаболизме пуриновых нуклеотидов. Авторы предположили, что пуриновые нуклеотиды могут снижать эффективность действия антибиотиков. Было установлено, что внесение в среду 2 мМ гуанина и 5–20 мМ аденозиндифосфата снижало эффективность ампициллина и доксициклина. Полученные результаты были подтверждены и другими авторами [29, 30]. Авторами была выявлена связь нарушения метаболизма пуринов с повышением уровней АФК [28, 31–33]. Для этого бактериальные суспензии инкубировали в присутствии ампициллина или доксициклина, и определяли содержание АФК с помощью красителя диацетатдихлор-дигидрофлуоресцеина (DCFH-DA). Было установлено, что интенсивность флуоресценции в присутствии ампициллина и доксициклина практически одинакова, а внесение в среду культивирования бактерий гуанина и ADP (аденозиндифосфата) снижало интенсивность флуоресценции DCFH-DA в 1,5 раза [28], что свидетельствует о возможности использования красителей-зондов, чувствительных к АФК, в качестве индикаторов эффективности действия антибиотиков различных типов и механизмов действия. Необходимо отметить также, что DCFH-DA способен проникать через клеточные мембраны [34], однако, авторы предпочли анализировать содержание АФК в клеточных гомогенатах и работа выполнена с использованием единственного вида бактерий *L. plantarum*.

Работа Yeо и коллег [35] посвящена разработке метода определения МИК устойчивых к карбапенемам штаммов *Acinetobacter baumannii* с использованием проточной цитофлуориметрии. Авторы предположили увеличение уровней АФК на основе ранее опубликованных работ [36–40]. В эксперименте использовали 3 клинических изолята и 15 антибиотиков, принадлежащих к следующим классам: аминогликозиды (амикацин), β-лактамы, тетрациклины, фторхинолоны (левофлоксацин), полимиксин В, рифампицин, триметоприм/сульфаметоксазол (TMP/SMX). Интенсивность флуоресценции клеток после окрашивания красителем-зондом RedoxSensor™ Green (RSG), реагирующим на активность редуктаз в электрон-транспортной цепи бактерий, оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Под МИК подразумевали наименьшую концентрацию антибиотика, дающую ≥1,5-кратное увеличение интенсивности флуоресценции. Полученные данные совпали с результатами классического AST в случае β-лактамов (точность 83,3%) и TMP/SMX (точность 100%). В случае левофлоксацина совпадение составило 33,3%, рифампицина – 0%, амикацина – 33,3% и для тетрациклина – 33,3%. Длительность анализа составила 5 часов.

Таким образом, в рассмотренных работах анализ проводили на бактериальных изолятах, а сам анализ занимал 5–6 часов и требовал относительно длительного культивиро-

вания в присутствие антибиотика, что все же не уменьшает потенциала использования сенсоров окислительного стресса. В целом, использование флуоресцентных зондов с высокими квантовыми выходами позволяет проводить относительно быстрый, чувствительный и недорогой анализ жизнеспособности культур бактериальных клеток, что необходимо для оценки МИК и АСТ.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ, РЕАГИРУЮЩИХ НА НАРУШЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МЕМБРАНЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В настоящее время известно много красителей, применяющихся для выявления жизнеспособных бактерий и бактериальных клеток, утративших целостность плазматической мембраны под действием антибиотиков. Так, в работе Tawakoli и соавторов [41] сообщается о сравнении результатов на модели роста бактериальных биопленок на поверхности дентина. Для окрашивания живых клеток использовались Calcein AM, 5(6)-диацетат карбоксифлуоресцеина (CFDA), диацетат флуоресцеина (FDA) и диацетат тетрахлорфлуоресцеина (TFDA), а в качестве красителей, флуоресцирующих только после проникновения в клетки через поврежденную плазматическую мембрану – иодид пропидия (PI), бромид пропидия (EtBr) и Sytox red. Краситель Syto 9, использовался для определения общей численности бактерий вне зависимости от их жизнеспособности. Было показано, что использование EtBr и PI при инкубации более 10 мин дают завышенную долю нежизнеспособных бактерий ввиду неспецифической токсичности. Наименьшее число искажений, связанных с токсичностью зонда, было выявлено при использовании Sytox red, который может по своим спектральным характеристикам пригоден для использования в паре с FDA. Авторы работы анализировали численность жизнеспособных и нежизнеспособных клеток на пластинах дентина, инкубированных в ротовой полости добровольцев, по прошествии 120 мин. Однако, окрашивание Calcein AM, CFDA, FDA и Sytox red не требует длительной инкубации, что позволяет использовать их для визуализации воздействия антибиотиков в реальном времени или в условиях кратковременной (5–10 мин) инкубации с красителями. Сам подход, напоминает классический многоцветный анализ с помощью проточной цитофлуориметрии и в целом подходит для анализа смешанных культур, однако, в работе не проводилась оценка кинетики гибели клеток в ответ на действие антибиотиков.

Стоит отметить, что сама окраска, как в случае сенсоров окислительного стресса, так и в случае сенсоров целостности мембран занимает 5–20 минут, не требовательна к чистоте культур, а случае использования проточной цитометрии метод не требует большого количества клеток ( $10^3$ – $10^5$  КОЕ).

Важным вопросом, характеризующим пригодность нового метода экспресс-оценки антибиотикорезистентности смешанных культур и изолятов является сходимость результатов с данными традиционных тестов. С этой точки зрения интересны данные, посвященные изучению механизма бактерицидного действия макулатина 1.1 (Mac1) – антимикробный пептид кожи австралийской древесной лягушки *Litoria genimaculata* в отношении *E. coli* и *S. aureus* с применением красителя Sytox Green, окрашивающего поврежденные, но не полностью жизнеспособные клетки. Авторы установили, что Mac1 эффективно действует на *S. aureus* (минимальная концентрация, полностью останавливающая рост культуры – 4 мкМ), но не на *E. coli*, где остановка роста достигалась только при 64 мкМ. При этом флуоресценция Sytox Green при взаимодействии как с *S. aureus*, так и с *E. coli* с использованием проточной цитофлуориметрии возникала уже

при концентрации Mac1 в среде 200 нМ, и краситель не позволял выявить различия в чувствительности бактерий к антимикробному агенту [42].

Barг и соавторы [43] показали на модели патогенных *Mycobacterium tuberculosis* и вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG с применением проточной цитофлуориметрии, что сочетание окраски красителями Calcein AM для живых и SYBR-gold для поврежденных клеток с нарушенной плазматической мембраной позволяет с высокой скоростью и точностью оценивать количество КОЕ в культурах, находящихся на ранних стадиях роста (до средней логарифмической фазы). В то же время, использование этого метода для оценки эффективности действия антибиотиков, используемых для лечения туберкулеза: рифампицин, канамицин, изониазид и этамбутол, показало результаты, только отчасти коррелирующие с результатами бактериологических посевов. Было установлено, что снижение числа КОЕ в культурах *M. tuberculosis* и *M. bovis* происходило существенно быстрее, чем снижение доли Calcein AM-положительных клеток или увеличение доли SYBR-gold-положительных клеток. Это означает, что в определенный момент времени большинство клеток в культуре, обработанной антибиотиком, остаются структурно неповрежденными и сохраняют метаболическую активность, но утрачивают способность к размножению (образованию колоний). Оценки фармакодинамического эффекта с помощью проточной цитофлуориметрии, дали результаты, существенно отличающиеся от результатов, полученных при подсчете КОЕ: эффект рифампицина на сокращение количества КОЕ был аналогичен эффекту изониазида, хотя скорость сокращения Calcein AM-положительных клеток под действием рифампицина оказалась заметно выше, чем в случае изониазида. Авторы пришли к выводу, что использование проточной цитофлуориметрии не может рассматриваться в качестве эквивалентной замены микробиологического метода, но и дает более развернутую информацию о фармакодинамике антимикобактериальных препаратов, которая не может быть получена при подсчете КОЕ. Однако, остается неясным, является ли эта информация клинически значимой. В качестве одной из гипотез, объясняющих различия в результатах измерений, высказывается предположение, что необратимо поврежденные микобактерии в течение долгого времени могут сохранять метаболическую активность и остаточную ферментативную активность. В качестве альтернативной гипотезы высказано предположение, что причиной расхождений является склонность микобактерий под действием антибиотиков переходить в метаболически пассивное (дормантное) состояние, выход из которого возможен, но происходит медленно и обусловлен соблюдением ряда условий. Тогда FCM-тесты на метаболическую и структурную целостность стали бы более значимыми показателями жизнеспособности. Во втором случае результаты, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии, могут оказаться более значимыми для оценки состояния культур и их чувствительности к антибиотикам.

Интересный пример использования флуоресцентных красителей-зондов для изучения клинически значимых проявлений антибиотикорезистентности и фармакологического действия антибиотиков в отношении *M. tuberculosis* приведен в работе Olivença и соавторов [44]. Выбор путей антибиотикотерапии этого возбудителя осложнен его высокой фоновой устойчивостью ко многим лекарственным препаратам, крайне медленным метаболизмом, а также способностью к впадению в дормантное состояние, позволяющее переживать даже длительные периоды антибиотикотерапии. В последние годы заболеваемость туберкулезом во многих странах, таких как Индия, Южная Африка, Россия и ряде других продолжает расти, что придает особую актуальность

этому направлению. В этой связи возрос интерес к использованию для лечения туберкулёза  $\beta$ -лактамов, которые не входят в перечень традиционных средств терапии этого заболевания, а лишь как вспомогательных препаратов. Целью работы являлось выявление синергизма между  $\beta$ -лактамами и противотуберкулезными препаратами: этамбутолом и изониазидом. В работе использовался типовой штамм *M. tuberculosis* H37Rv и восемь оригинальных клинических изолятов, в том числе, четыре лекарственно-устойчивых штамма. Было показано, что сочетанное применение этамбутола и  $\beta$ -лактамов даёт выраженный синергетический эффект, заметно превышающий синергизм этамбутола и изониазида, существование которого считается убедительно доказанным всей клинической практикой борьбы с туберкулёзом. В макрофагах, инфицированных изолятом ТНР-1, сочетание этамбутола и меропенема неизменно позволяло достигать более высокой эффективности элиминации возбудителя. В качестве метода исследования использовалась проточная цитофлуориметрия, а в качестве зонда – конъюгат антибиотика ванкомицина с красителем BODIPY. Ванкомицин эффективно связывается с пептидогликаном клеточной стенки бактерий, в том числе, *M. tuberculosis*. Культуры *M. tuberculosis* обрабатывали этамбутолом в концентрации 2 мг/л, меропенемом в концентрации 0,5 мг/л и их комбинацией. Высокоустойчивый штамм MDRIII дополнительно обрабатывали этамбутолом в дозе 16 мг/л индивидуально, либо в сочетании с меропенемом и клавулановой кислотой. Результаты экспериментов показали, что нарушение доступа  $\beta$ -лактамов к периплазматическим транспептидазам, характерное для многих штаммов *M. tuberculosis*, устраняется комбинации с этамбутолом, что объясняется одновременным подавлением синтеза арабиногалактана и пептидогликана – двух ключевых компонентов клеточной стенки. Таким образом, комбинация  $\beta$ -лактамов с этамбутолом может значительно повысить эффективность лечения туберкулеза.

Gregorchuk и соавторы [45] использовали мембрано-непроникающие флуоресцентные зонды пропидия иодида и этидия бромида, позволяющие определять наличие у *E. coli* детерминант устойчивости к хлоргексидину, связанных с представленностью белков-транспортеров в клеточных мембранах: гиперэксперсии эффлюксных белков, в частности, *acrB*, *qacE* и *aceI*, и ноль-мутации о генам поринов *ompCF* и *miaA*. Было показано, что сходимость с данными микробиологического высева удается получить только для мутантов по гену *miaA* при использовании PI, что делает практически нецелесообразным его использование для первичной характеристики вновь полученных изолятов бактерий и смешанных культур.

Yang и коллеги разработали [46] метод фенотипической детекции множественной лекарственной устойчивости патогенных дрожжей *Candida albicans* к азольным противогрибковым препаратам. Они использовали Calcein AM, как индикатор множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках млекопитающих. Было установлено, что Calcein AM не выбрасывается из клеток *C. albicans*, содержащих ген CDR1, который кодирует АТФ-зависимый транспортер. Однако, использование флуоресцеиндиацетата (FDA) в этом качестве оказалось эффективным и дало хорошую сходимость с данными микробиологического высева. Было установлено, что добавление в среду азида натрия увеличивало флуоресценцию резистентных клеток, несущих ген CDR1, более чем в 20 раз, в то время как повышение интенсивности флуоресценции FDA чувствительных к лекарственным препаратам клеток *C. albicans* при внесении азида натрия наблюдалось только в три-четыре раза.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДИКАТОРОВ АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Активность электрон-транспортной цепи, локализованной в плазматической мембране бактерий, является перспективным индикатором, позволяющим оценивать эффективность бактерицидного действия антибиотиков, поскольку даже кратковременное падение электрохимического потенциала ниже критического порога приводит к необратимой гибели бактериальной клетки [47]. Для оценки активности электрон-транспортной цепи бактерий можно использовать соли тетразолия [48] или резазурин (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид) [49].

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) при физиологических значениях рН обладает положительным зарядом, благодаря чему проникает в живые клетки. Другие производные тетразолия – (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолиум) (МТS), (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксамид) (ХТТ) и (2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфопенил)-2Н-тетразолиум) (WST-8) несут отрицательный заряд, что не позволяет им проникать в бактериальные клетки [50]. Для измерения активности дыхательной цепи эти соединения используются в сочетании с промежуточным акцептором электронов, который переносит электроны из плазматической мембраны на конечный акцептор. В качестве медиатора может использоваться феназина метосульфат (PMS) [51]. В результате восстановления солей тетразолия образуется формазан, который может быть определен спектрофотометрическими или электрохимическими методами.

Использование резазурина и солей тетразолия даёт сопоставимые результаты, однако, продукт восстановления резазурина – резазурфин, может подвергнуться дальнейшему восстановлению с образованием неокрашенного и нефлуоресцирующего дигидропорезуруфина [52], а нерастворимый в воде формазан, может выпадать в осадок внутри живых бактериальных клеток, нарушая их жизнеспособность, что вносит искажения в результаты анализа [53].

Недостатком обоих соединений является то, что до воздействия антибиотика интенсивность измеряемого в эксперименте сигнала является максимальной, а по мере воздействия антибиотика на культуру она постепенно снижается – таким образом, необходимо определять небольшое падение сигнала на фоне максимального первоначального значения, что приведет к высокой погрешности измерений.

Oeschger и коллеги отметили, что для визуального анализа наиболее удобны резазурин (PrestoBlue) и ХТТ, тогда как МТТ оказывается наиболее доступен с точки зрения себестоимости при анализе резистентности *Neisseria gonorrhoea* [54].

Liu и соавторы одновременно измеряли интенсивность дыхания и концентрацию АФК с использованием производного тетразолия WST-8 и 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата при воздействии антибиотиков на дормантные формы *E. coli* [55].

Zhang и коллеги сконструировали автоматическую колориметрическую систему с модулем иммуномагнитной сепарации на основе микропланшета, позволяющую одновременно анализировать до 16 комбинаций штаммов бактерий и антибиотиков при времени пробоподготовки до 45 мин, чувствительности  $10^3$  КОЕ/мл и длительности анализа 6 часов [56].



Сгане и коллеги продемонстрировали возможность электрохимической детекции резаруфина вплоть до 15,6 мкМ с помощью печатных электродов для исследования фенотипической устойчивости *E. coli* ATCC 25922 к гентамицину – анализ занял 90 минут (за это время была выполнена инокуляция бактериями искусственного эквивалента мочи, инкубация с антибиотиком и электрохимическое измерение) [57].

Также использовался 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТС) для анализа активности *Helicobacter pylori* отдельно или в присутствии доксициклина, левофлоксацина, амоксициллина, кларитромицина и метронидазола [58].

Ikeda и коллеги снизили время анализа устойчивости *S. aureus* до 2 часов при электрохимической детекции продукта восстановления МТТ [59].

Таким образом, оперативность использования сенсоров активности дыхательной цепи лежит в пределах от 1,5 (при электрохимической детекции) до 6 часов (при колориметрической детекции), а сами протоколы могут быть использованы для оценки чувствительности как изолятов, так и смешанных культур, содержащих относительно небольшие количества клеток (от  $10^3$  КОЕ/мл).

Анализ работ [54–58], а также цитируемых в них источников, позволяет сделать вывод, что использование резазурина и производных тетразолия в настоящее время является распространённым методом ускорения анализа антибиотикорезистентности бактерий, дающим результаты, вполне совпадающие с результатами классических культуральных методов, и позволяющим сократить длительность исследования в 3–4 раза по сравнению с классическим методом подсчета колоний или определения оптической плотности культуры.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ NADH В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

NADH является одним из основных медиаторов, обеспечивающих передачу восстановительных эквивалентов из катаболических реакций в дыхательную цепь [60]. Оптические свойства NADH и  $\text{NAD}^+$  существенно различаются. Спектр поглощения NADH показывает два максимума при 250 нм и 340 нм;  $\text{NAD}^+$  имеет единственный максимум при 250 нм [61]. При возбуждении ультрафиолетовым светом NADH, в отличие от  $\text{NAD}^+$ , флуоресцирует синим цветом (максимум испускания ~460 нм). Так, Chance и соавторы [62, 63] описали возможность исследования состояния митохондрий с использованием NADH в качестве эндогенного зонда, а Perinbam и коллеги использовали подобный подход для исследования изменения метаболического профиля и резистентности *Pseudomonas aeruginosa*, определяя содержание свободной и связанной с ферментом фракций NADH с помощью флуоресцентной прижизненной микроскопии путем определения времени жизни возбужденного состояния (FLIM). Так, популяция с низкой и повышенной вирулентностью различались по метаболическому профилю [64]. Высоковирулентная популяция имела сниженную концентрацию NADH, связанного с ферментом, а также сниженное общее содержание NADH. Эта работа свидетельствует о перспективности использования NADH в качестве эндогенного маркера для оценки эффективности действия антибиотиков на культуры бактерий.

Другой пример использования NADH в качестве метаболического индикатора продемонстрировал Biener и соавторы [65]. Культуры *S. aureus*, облученные одной или двумя дозами лазерного излучения при интенсивности 121 Дж/см<sup>2</sup> с длиной волны 405 нм, исследовались с помощью лазерных микроскопов, что позволяло обнаруживать

эндогенные флуоресцирующие объекты с заранее неизвестными спектральными характеристиками, а также измерять интенсивность флуоресценции потенциал-чувствительного красителя 3,3'-диэтилоксакарбоцианина йодида. Исследование эндогенной флуоресценции позволило обнаружить в облученных клетках возбужденные состояния порфиринов, NADH и FAD, а экзогенный сигнал позволил наблюдать за скоростью падения мембранного потенциала. В течение первых 5 минут после облучения первой дозой света фиксировались быстрые изменения всех измеряемых параметров, а после второго облучения аналогичные изменения протекали существенно медленнее. Эти результаты свидетельствовали о том, что раннее антимикробное действие синего света обусловлено нарушением целостности мембран. Цитируемая работа показывает возможность использования NADH и FAD в качестве эндогенных флуоресцирующих зондов, способных дать важную информацию об изменении клеточного метаболизма в течение нескольких минут после применения к бактериям повреждающего воздействия.

Также была описана система для наблюдения за скоростью роста бактерий на поверхности пищевых продуктов, основанная на измерении интенсивности флуоресценции порфиринов и NADH [66]. Следует подчеркнуть, что синтетические производные порфиринов, обычно используемые в каталитической или фотодинамической терапии [67–69], также нашли применение в качестве сенсоров для анализа бактериальных клеток [70,71].

В работе Dixon и коллег [72] измерялось светорассеяние и аутофлуоресценция, связанная с дыханием изолятов бактериальных клеток *E. coli* и *S. epidermidis* после воздействия двух антибиотиков, принадлежавших к группам аминогликозидов и  $\beta$ -лактамов, с помощью цитофлуориметрии в каналах FAD и NADH с целью быстрого фенотипического тестирования чувствительности. Полученные результаты подтвердили возможность проведения анализа изолятов на антибиотикорезистентность за 2 часа.

Резюмируя, можно заключить следующее:

1. Наиболее оперативными из описанных методов определения фенотипической устойчивости являются [57] – 90 мин, [59] – 2 часа и [72] – 2 часа. Две первых работы основаны на электрохимической детекции резаруфина и формазана, а третья работа – на оценке аутофлуоресценции NADH и изменения мембранного потенциала с помощью проточной цитофлуориметрии. Использование спектрофотометрического и спектрофлуориметрического анализа в большинстве работ обеспечило время проведения анализа около 6 часов.

2. Использование флуоресцентных красителей, позволяющих детектировать нарушение целостности плазматической мембраны или падение электрохимического потенциала, а также определение концентрации АФК теоретически способно давать более короткие времена проведения анализа, так как связано с нарастанием измеряемого сигнала во время инкубации. Однако, цитируемые работы не ставили целью повышение экспрессности.

3. Использование проточной цитофлуориметрии показало пригодность для работы с некультивированными бактериальными изолятами. Преимуществом этого метода является также возможность одновременного проведения инкубации бактерий с антибиотиком и детекции, что обеспечивает максимальную оперативность анализа, существенным недостатком же является дороговизна приборов и необходимость проведения анализа квалифицированным персоналом.

4. Использование иммуносорбции для обогащения культур обеспечивает возможность анализ только заранее известных групп микроорганизмов [56]. Однако, использование универсальных функционализированных подложек, способных связывать бактерии всех типов, способно существенно ускорить проведение анализа.

### **III. ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ**

Одним из распространённых методов микробиологических исследований является измерение комплексного импеданса среды, в которой находятся клеточные структуры. Хотя анализ электрического отклика среды с микроорганизмами (в том числе в присутствии антибиотиков) в настоящее время не является сертифицированным методом, используемым в клинической практике, исследования в данной области достаточно активно развиваются, предоставляя исследователям возможность оперативного количественного анализа динамики изменения состояния сред, содержащих микроорганизмы в условиях, близких к естественным. В самом распространённом случае ячейка для измерения импеданса представляет собой закрытую или проточную, стеклянную или полимерную камеру небольшого объема (единицы и десятки микролитров), в одну из стенок которой интегрированы два и более микро-электродов (в основном тонкий слой инертного металла) малой площади с небольшим расстоянием между ними (например, толщина электрода 15 мкм с расстоянием между ними 15 мкм). Поверхность электродов зачастую подвергается химической модификации, в том числе антителами или низкомолекулярными линкерами, для специфической или неспецифической адгезии бактериальных клеток. В подобном исполнении, такие камеры могут быть легко интегрированы в микрофлюидные системы. При внесении бактериальной культуры в камеру, клетки, взаимодействуя с поверхностью электродов, изменяют площадь их контакта со средой, а вещества, в том числе низкомолекулярные ионы, выделяемые в среду, изменяют проводимость межклеточного пространства, что в целом изменяет проводимость среды, которая фиксируется путем отведения. Стоит отметить, что использование такого подхода не подразумевает вмешательства в метаболизм клетки путем введения зондов или внесения других ксеногенных молекул, за исключением антибиотиков при определении МИК и AST, что позволяет вести продолжительное наблюдение за культурой в «интактных» условиях.

Эквивалентная электрическая схема набора клеток в жидкой среде представляет собой комбинацию активных сопротивлений жидкой фазы, внутриклеточной жидкости, а также реактивных емкостных сопротивлений, образующихся на границах раздела фаз (рисунок 1 А).

Эти границы фактически совпадают с клеточными мембранами в силу того, что электропроводность самих мембран значительно ниже электропроводности жидких фаз [73]. Изменение комплексного сопротивления (импеданса), свидетельствует об изменении в ростовой среде. Под действием микроорганизмов заряженные продукты метаболизма выделяются в среду, при этом незаряженные или слабо заряженные субстраты могут превращаться в более сильно заряженные конечные продукты. Таким образом, электрохимические изменения в ростовой среде приводят к существенным изменениям импеданса.

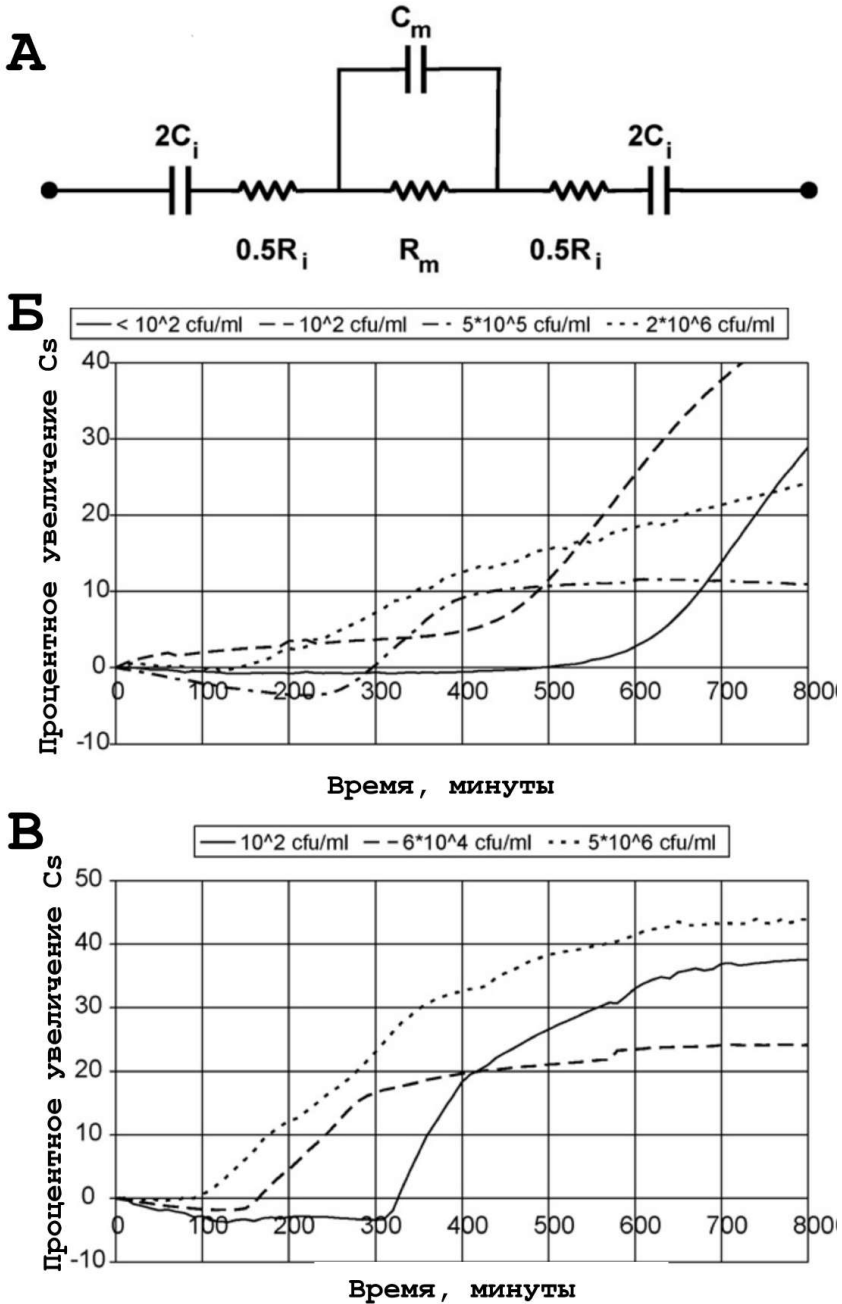


Рис. 1. Эквивалентная схема системы, состоящей из клеток в жидкой среде.

$R_m$  и  $C_m$  – сопротивление и емкость объемной среды,  $R_i$  и  $C_i$  – сопротивление и емкость границы раздела электрод-электролит (А). Процентное увеличение емкостной составляющей импеданса образца в зависимости от времени при использовании в качестве субстрата продуктов из (Б) мороженого и (В) среды Лурия-Бертани (LB) [73].

Базовая методика подразумевает использование монохроматического сигнала с частотой, линейно изменяющейся со временем. В случае, когда частота синусоидального тестового сигнала, подаваемого на электроды, относительно низкая (ниже  $\sim 1$  МГц), емкостью среды  $C_m$  можно пренебречь, и систему можно смоделировать с помощью более простой схемы, состоящей только из последовательно соединенных сопротивления  $R_s$ , определяемого преимущественно активным сопротивлением межклеточной жидкости, и емкости  $C_s$ , обусловленной двойным электрическим слоем на клеточной мембране [74]. При концентрации клеток порядка  $10^6 - 10^7$  ед./мл. часто проявляются экспоненциальные изменения импеданса. Основы практического применения метода измерения комплексного импеданса среды для биологических систем, называемого ещё импедансной микробиологией, в современном его виде изложены в работах Фистенберга-Идена и Эдена [75], Ур и Брауна [76], Кэди [77] и других авторов.

Особенностью временного электрического отклика является постоянство величин  $R_s$  и  $C_s$  до тех пор, пока концентрация бактерий не достигнет критического значения  $C_{TH}$ . Эта величина зависит от штамма бактерий, состава среды, геометрии и расположения электродов, однако всегда находится в достаточно узком диапазоне  $10^6 - 10^7$  КОЕ/мл. При достижении и превышении критической величины  $C_{TH}$  величины активного сопротивления  $R_s$  и ёмкости  $C_s$  резко изменяются – в частности, для бактерий как правило происходит уменьшение  $R_s$  и увеличение  $C_s$ , а для дрожжей – наоборот, уменьшение  $C_s$  и увеличение  $R_s$ . После резкого изменения электрофизических параметров системы эти параметры выходят на временное плато. Измеряемой величиной является время достижения концентрации  $C_{TH}$ , определяемое по перегибу кривых  $R_s$  и  $C_s$  при стандартных условиях роста бактериальной культуры –  $DT$ . Чем выше начальная концентрация, тем время меньше. Результаты исследований [78, 79] показывают, что величина  $DT$  является линейной функцией начальной концентрации культуры  $C_0$  в соответствии с формулой:

$$DT = A \cdot \log_{10}(C_0) + B, \quad (1)$$

где параметры  $A, B$  зависят от штамма бактерий, состава среды, геометрии и т.п.

Данный способ позволяет проводить быструю диагностику [80] и предоставляет возможность автоматизации по сравнению с традиционным подсчётом концентрации КОЕ [81, 82], в результате можно эффективно определять исходные концентрации широкого класса одноклеточных культур – бактерий, грибковых культур – промышленным способом в продуктах, водоёмах и т.п. [80, 83]. В работе [73] отмечается, что изменение ёмкости  $C_m$  более информативно с точки зрения определения начальной концентрации бактерий. Для иллюстрации сказанного, на рисунке 1 (Б и В) приведены типичные временные зависимости изменения  $C_m$  с ростом числа *E. coli* при  $+39^\circ\text{C}$  для ряда продуктов для мороженого и модельной среды Лурия-Бертани (LB) при различных начальных концентрациях. Время начала спада ёмкости  $DT$  связано со средним временем размножения бактерий  $T_G$  соотношением:

$$T_G = \frac{DT + \tau_{\text{delay}}}{\log_2(C_{TH}/C_0)}, \quad (2)$$

где  $\tau_{\text{delay}}$  – время температурной стабилизации системы,  $C_0$  – начальная концентрация,  $C_{TH}$  – пороговая концентрация бактерий, при которой  $C_m$  начинает расти.

Описанный метод не требует разбавления образца в других средах, и является удобным для автоматизации. Недостатком является высокий уровень достоверно определяемых концентраций –  $10^5$  КОЕ/мл.

Значительно повысить чувствительность и одновременно уменьшить время анализа позволяют микрофлюидные системы. Обычно для производства микрофлюидных чипов используется полидиметилсилоксан, обладающий инертностью и газопроницаемостью, что позволяет проводить инкубацию живых клеток, но также используются и другие материалы – поли(метил метакрилат), полистирол, поликарбонат, а также биоразлагаемые, в основном используемые в биомедицине – полигидроксибутират и полилактат [84].

Yang и коллеги [85] показали эффективность использования такого подхода для контроля роста бактерий. На рисунке 2 Е приведены данные кинетики относительного изменения сопротивления с ростом числа бактерий – *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. saprophyticus*. Величинами, отображаемыми на графике как ординаты, является относительное изменение сопротивления, определяемое как

$$\Delta R(t) / \Delta R(0) = (R(t) - R_{em}) / (R(0) - R_{em}), \quad (3)$$

где  $R(t)$  – сопротивление в момент времени  $t$ ,  $R(0)$  – сопротивление непосредственно после загрузки в ячейку объекта измерений,  $R_{em}$  – сопротивление ячейки без бактерий. Предполагается, что бактерии *K. pneumoniae* и *S. saprophyticus* неподвижны и легко задерживаются в микроканалах; *E. coli* подвижна, но маловероятно, что она изменит свое направление и покинет герметичный микроканал. Все изменения электрического сопротивления близки к экспоненциальным:

$$\Delta R(t) / \Delta R(0) \approx n(t) / n(0) \approx e^{rt}, \quad (4)$$

где  $n(0)$  и  $n(t)$  – концентрации бактерий в начальный момент времени и момент времени  $t$ , соответственно, а скорость роста  $r$  связана с временем размножения (удвоения)  $t_d$  соотношением  $t_d = \ln(2) / r$  для каждого штамма.

На вставке рисунка 2 Е показаны значения  $t_d$ , полученные в результате линейной аппроксимации натуральных логарифмов кривых роста. Измеренные в данной работе величины  $t_d$  несколько выше, чем описано в литературе, что авторы связывают с возможной ограниченностью доступности питательных веществ в микроканалах [86].

Измерение электрического отклика бактериальной среды может быть использовано для определения чувствительности к антибиотикам. Используя микрофлюидную оснастку, в работе [85] проведено определение чувствительности *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. saprophyticus* к ампициллину и налидиксовой кислоте по изменению относительного электрического сопротивления (рисунок 2 А, Б, В) [85]. Также был выполнен анализ «электрических сигнатур» антибиотиков. Для этого авторами после ВЧ-фильтрации сигнала во временной области и статистической обработки флуктуаций сигнала, обусловленных специфическим поведением колоний бактерий (*E. coli*) при наличии антибиотика, были получены зависимости статистического распределения флуктуаций. На рисунке 2, Г приведено распределение функции плотности вероятности (PDF) флуктуаций измеряемого сопротивления, а на рисунке 2 Д – спектральная плотность мощности этого же сигнала (PSD). Кривая, соответствующая системе без антибиотика (левый рисунок 2, Г) хорошо описывается функцией Гаусса; кривые для систем с добавлением налидиксовой кислоты (средний рисунок) и ампициллина (правый рисунок) описываются аналитическими экспоненциально-степенными функциями более сложного вида, каждая со своим набором численных параметров. Таким образом, анализ электрического отклика системы позволяет количественно характеризовать как устойчивость клеточных структур к антибиотикам, так и специфическое действие антибиотиков.

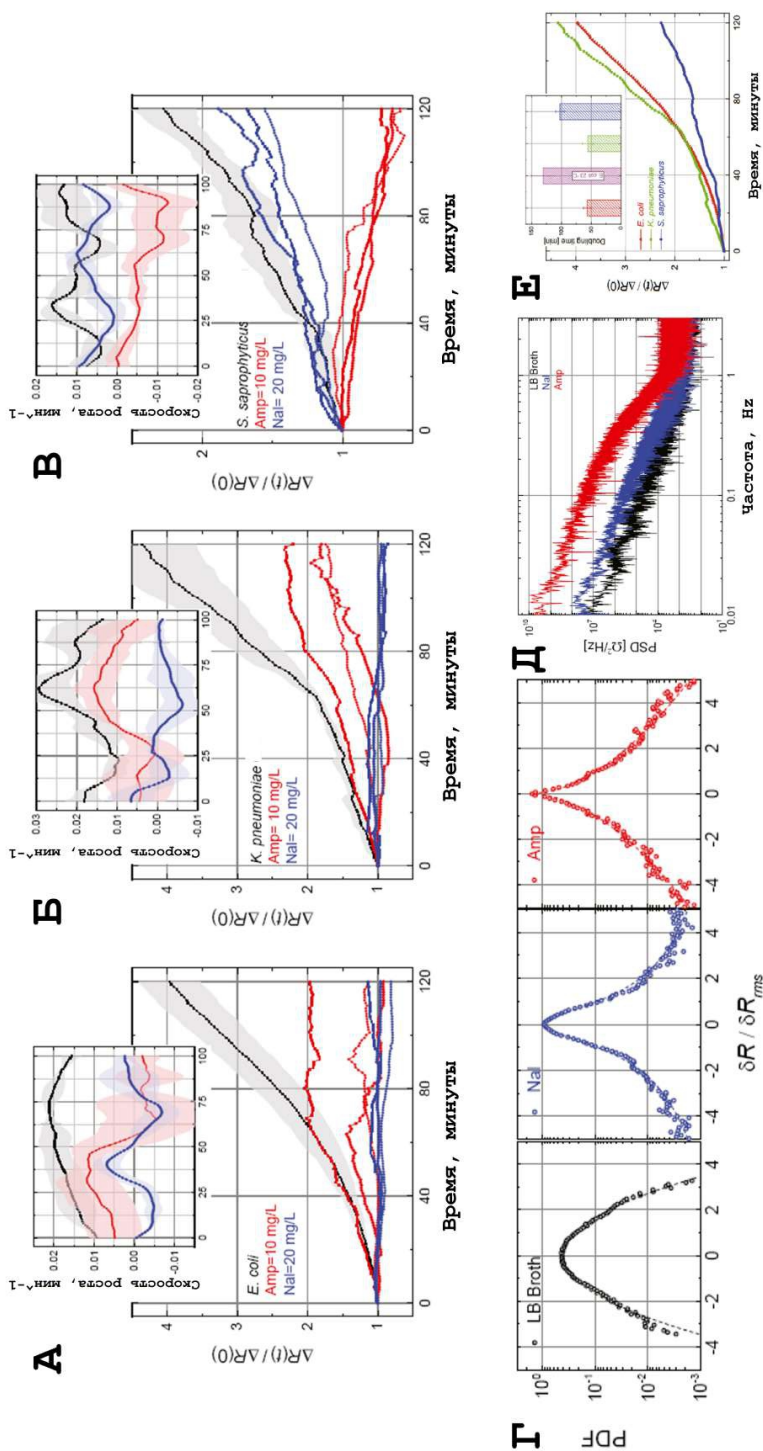


Рис. 2. Чувствительность электрического отклика *E. coli* (А), *K. pneumoniae* (Б), *S. saprohyticus* (В) к антибиотикам типа ампициллина и налидиксовой кислоты; чёрная кривая – среда без антибиотиков.

Функция плотности вероятности для среды LB с *E. coli* без антибиотика (слева), с и налидиксовой кислотой (в середине) и с ампициллином (справа) (Г).

Спектральная плотность мощности сигнала флуктуаций сопротивления в среде LB с *E. coli* без антибиотика (снизу), с и налидиксовой кислотой (в середине) и с ампициллином (сверху) (Д).

Кривые роста для *E. coli* (красная кривая), *K. pneumoniae* (зеленая кривая) и *S. saprohyticus* (синяя кривая) при температуре 37 °С в среде LB. Каждая кривая представляет собой среднее значение для трех независимых экспериментов. На вставке показано время деления (Е). Из работы [85].

Если рассматривать не временную, а частотную зависимость электрического отклика системы, то нетрудно заметить, что она также определяется соотношением удельных электропроводностей внутриклеточной, межклеточной жидкостей и клеточных мембран. Для анализа применяют несколько вариантов эквивалентных схем, в частности модель Фрике-Морзе [87–89], Петрова и другие. Так, на рисунке 3 А, Б видно отличие, заключающееся в учёте влияния активного сопротивления клеточных мембран через активное сопротивление  $R_m$ .

Для бактерий, данная величина значительно превышает активное сопротивление жидкости. Вклад реактивной компоненты проявляется через включение ёмкости, образованной границе жидкой фазы, содержащей электролит, и изолирующей клеточной мембраны. Зависимость полного сопротивления  $Z$  от частоты демонстрирует следующие тенденции:

- Сопротивление на низких частотах постоянно и определяется сопротивлением межклеточной жидкости  $R$ , что связано с малой величиной ёмкости (высоким реактивным сопротивлением  $X_C$ ) при низких частотах.

- Сопротивление на высоких частотах из-за соотношения  $X_C \ll R$  также постоянно и определяется резистивным делителем, образованным активными сопротивлениями межклеточной и внутриклеточной жидкостей; следовательно, определив сопротивление в низкочастотном пределе  $Z_{нч} = R_0$  и  $Z_{вч}$ , можно определить сопротивление внутриклеточной жидкости.

- Промежуточная область спада полного сопротивления определяется ёмкостной реактивной компонентой двойного электрического слоя на клеточной мембране. В этой области по величине реактивной компоненты  $X_C$  можно судить о ёмкости, создаваемой клеточными мембранами.

Многочисленными исследованиями установлено, что мембраны отчётливо проявляют ёмкостные свойства только в живых клетках. При отмирании клеток это свойство утрачивается. Таким образом, анализ комплексного импеданса позволяет судить о жизнеспособности культур бактерий при воздействии внешних факторов без внесения каких-либо дополнительных компонентов (меток и пр.) в среду.

Simić и соавторы [87] предложили метод расчёта эквивалентных емкостей и комплексных сопротивлений для модели Фрике-Морзе, позволяющий использовать методику измерения комплексного импеданса в портативных и автономных недорогих системах в режиме реального времени.

Ghosh и коллеги [90], измеряя комплексный импеданс в частотной области, определили импеданс мембраны и зафиксировали взаимодействие мембраны с антибиотиком, используя полимиксин В, бацитрацин и меропенем. Известно, что грамотрицательные бактерии содержат две мембраны: наружную (НМ) и внутреннюю (ВМ). Наличие наружной мембраны придает грамотрицательным бактериям устойчивость к детергентам и высокомолекулярным антибиотикам. Для анализа взаимодействия антибиотика с НМ часто используются модели, такие как липидные бислои на подложке (SLB). Преимуществом SLB является двумерная плоская геометрия, которая совместима с количественными методами исследования поверхности, в частности, флуоресцентной микроскопией и методикой QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation). В последнее время технологию SLB используют также для электрохимических методов исследований, что позволяет проводить на одной подложке цикл оптических, физико-механических и электрохимических исследований. Такой подход был применён в



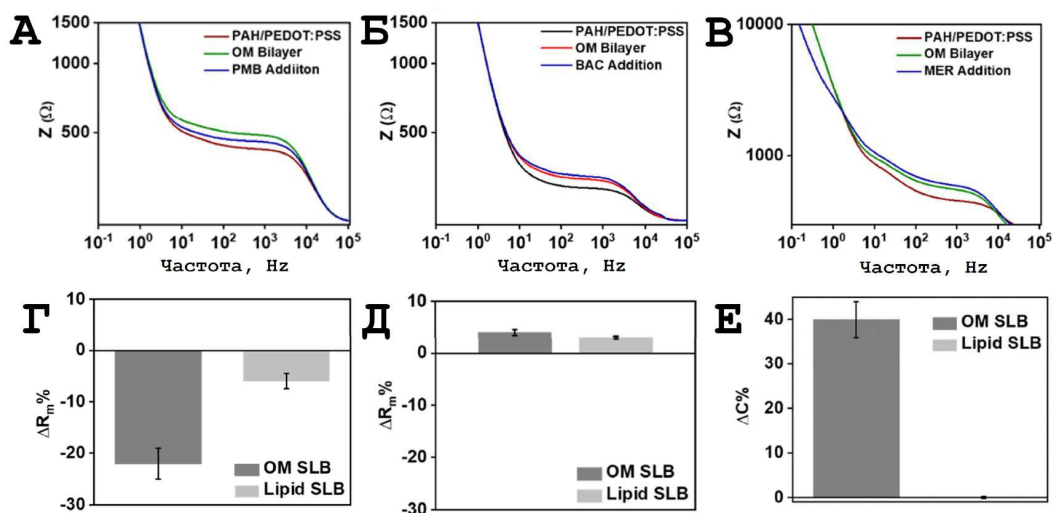


Рис. 3. (А–В): зависимость импеданса для ячеек с исходной подложкой (PAH:PEDOT:PSS), подложкой с модельной мембраной (OM Bilayer) и антибиотиками – (А) полимиксином В (PMB), (Б) бацитрацином (BAC), (В) меропенемом (MER); (Г – Е): гистограммы, иллюстрирующие изменение импеданса (Г, Д – активное сопротивление, Е – ёмкость) в той же конфигурации, что на (А – В). Из работы [87].

работе Simić и соавторов [87]. Использовали подложку из проводящего полимера – поли(3,4-этилендиокситиофен)полистиролсульфоната (PEDOT:PSS), измерения проводили по классической трёхэлектродной схеме с электродами Ag/AgCl и платиновой сеткой. Спектры электрохимического импеданса записывали для переменного синусоидального напряжения частотой от  $10^5$  до  $10^{-1}$  Гц. Этот частотный диапазон был выбран для регистрации частотно-зависимых изменений импеданса бислоя НМ ( $\sim 10$ – $10^4$  Гц), электрода ( $< 10$  Гц) и буфера ( $\sim 10^4$  Гц). Авторы использовали методику для мониторинга взаимодействия антибиотиков – полимиксин В, бацитрацин, меропенем – с образованным бислоем. На рисунке 3 (А, Б, В) приведены результаты измерений частотной зависимости импеданса для ячеек с исходной подложкой PAH:PEDOT:PSS, с модельной мембраной (OM Bilayer) и антибиотиками – (А) полимиксином В (PMB), (Б) бацитрацином (BAC), (В) меропенемом (MER). На рисунке 3 (Г, Д, Е) приведены соответствующие гистограммы, иллюстрирующие изменение импеданса после воздействия антибиотика, причём на (Г) и (Д) отражены изменения активного сопротивления, а на (Е) – ёмкости. В совокупности эти наблюдения за тремя различными антибиотиками подтверждают возможность использования методики для определения активности антибиотиков, воздействующих на мембраны, а также для оценки проницаемости антибиотиков через поры.

В ряде работ для количественного определения антибиотиков используют методы катодной и анодной инверсионной вольтамперометрии [91, 92], ионометрический метод [93, 94]. Нижняя граница определяемых содержаний антибиотиков составляет величины порядка  $10^{-9}$  мг/мл.

Резюмируя, можно заключить следующее:

1. Импедансометрия является одним из наиболее оперативных методов анализа жизнеспособности бактериальных культур – различия в присутствии антибиотиков можно наблюдать уже на 10–15 минуте инкубации [90].

2. Измерение «стандартной» общей проводимости культуры в сравнении с необработанным контролем достаточно для анализа МИК и AST как изолятов, так и смешанных культур.

3. Импедансометрия позволяет снимать электрические сигнатуры, потенциально применимые для идентификации изолятов, что, однако, неприменимо в случае смешанных культур.

4. Комбинация импедансометрии с микрофлюидными установками дает возможность оперативно анализировать состояние одиночных клеток в экстремально-малых объемах, что в некоторых случаях делает возможным анализ клинических образцов и исключает необходимость культивирования.

5. Недостатками «классической» импедансометрии является узкий диапазон (около одного порядка) и достаточно высокая концентрация клеток в суспензии для получения достоверных результатов (от  $10^5$  КОЕ/мл), которые нивелируются при применении микрофлюидных чипов. Также следует отметить, что в настоящее время использование методики, например, в области оценки устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, находится на стадии исследований и требует верификации для применения в клинической практике.

#### **IV. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ И ЕЕ МОДИФИКАЦИИ**

##### **ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ**

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) – метод колебательной спектроскопии, используемый для анализа различных биологических сред. Достоинствами метода является доступность приборов, легкость пробоподготовки, возможность интеграции с оптическими микроскопами [95–97] и разнообразие доступных модификаций метода [98, 99]. Относительная быстрота проведения анализа позволяет наблюдать различия в КР-спектре чувствительных и резистентных бактерий уже после 1–8 часов инкубации с антибиотиком (в зависимости от чувствительности метода и рода бактерий). К недостаткам относится сложность анализа КР-спектров, требующая применения методов хемометрики [95, 100, 101] или машинного обучения [102–104]. В целом, методы, основанные на КР-спектроскопии, не являются строго количественными, но существует множество адаптаций для частных задач количественного анализа, например, инкубация изолятов в присутствии  $D_2O$ , что приводит к появлению пиков в области «молчания» на КР спектрах свидетельствуя об активном метаболизме в клетках и формировании C–D связей (рисунок 4 А, Б) [105–107]. Практикуется также применение внутренних стандартов при анализе супернатантов бактериальных культур при помощи гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [108]. Внутренний стандарт может быть нанесен на ГКР-подложку непосредственно в процессе ее синтеза [109].

Использование КР-спектроскопии для анализа устойчивости осложняется тем, что антибиотики с различным механизмом действия оказывают различное влияние на метаболизм, т.е. интенсивность различных полос в КР-спектре может как увеличиваться, так и уменьшаться. В частности, Сингх с соавторами [110] указывает, что ципрофлоксацин

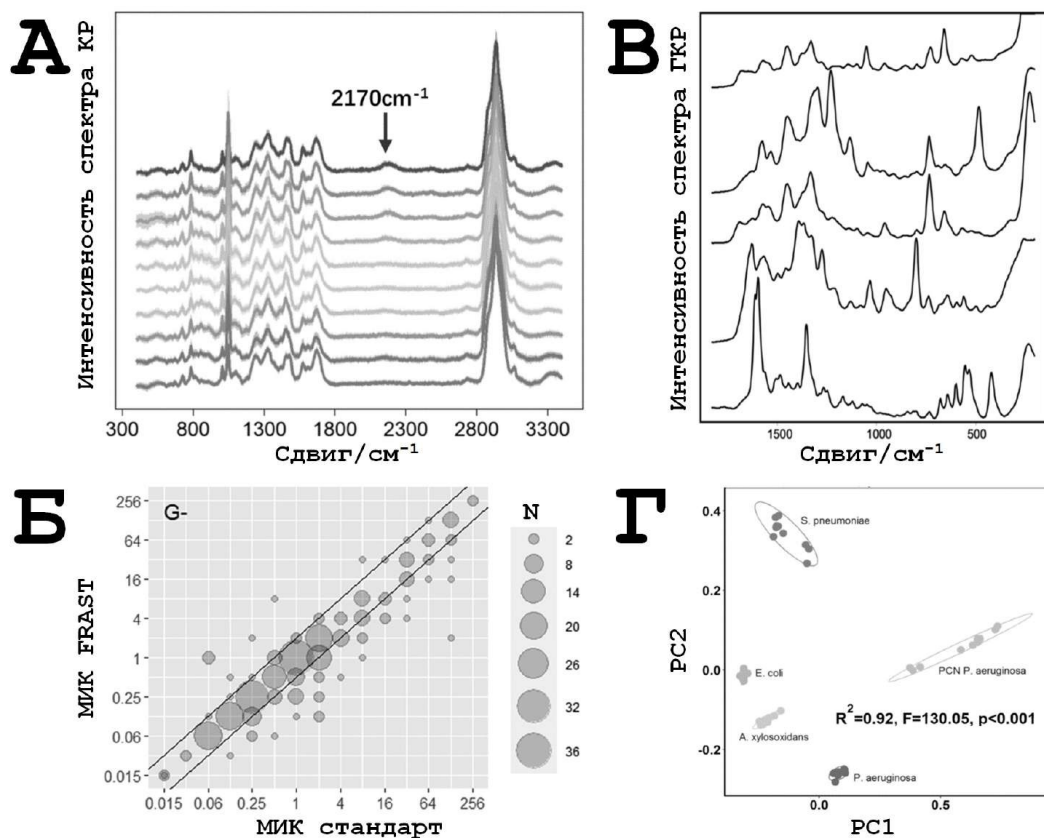


Рис. 4. А. Спектр комбинационного рассеяния (РАМАНовский спектр) штамма *E. coli* ATCC 25922 при различных варинатах инкубации в присутствии ципрофлоксацина и D<sub>2</sub>O – наблюдается появление пика С-Д (~2170 см<sup>-1</sup>) связей у некоторых образцов.

Б. Корреляция значений МИК для штаммов ATCC 27853, ATCC 35218, ATCC 25922, и ATCC 700603, рассчитанных методом микроразведений и методом КР-спектроскопии при инкубации в присутствии D<sub>2</sub>O [105–107].

В. ГКР спектры *A. xylosoxidans* B064 V2S2F, *S. pneumoniae* CF 108 T6, *E. coli* UM013, *P. aeruginosa* B004 V4E2E, и *P. aeruginosa* PA01.

Г. Кластеризация образцов штаммов с помощью анализа главных компонент по различиям в спектрах [115].

и меропенем уменьшают интенсивность полос, связанных с ДНК (667, 724, 785, 1378, 1480, 1575 см<sup>-1</sup>) и белками (640, 1662 см<sup>-1</sup>) и увеличивают интенсивность полос, связанных с липидами (891, 960, 1445 см<sup>-1</sup>). Гентамицин и нитрофурантоин, напротив, увеличивают интенсивность полос, связанных с ДНК, но уменьшают интенсивность полос, связанных с белками и липидами. В целом, изменения в метаболизме бактерий отражают механизм действия антибиотиков [111–113].

Использование ГКР по сравнению с КР позволяет значительно увеличить чувствительность [114]. На рисунке 4 В и Г приведены ГКР спектры различных микроорганизмов и пример их кластеризации с помощью анализа главных компонент. В основе ГКР

лежит взаимодействие вещества с плазмонной поверхностью, в качестве которой чаще всего используются наноструктуры на основе золота или серебра [115]. Как правило, ГКР можно отнести к одному из двух классов: ГКР на наноструктурированной твердой подложке [116–119] или ГКР с применением коллоидных частиц [101, 111, 120, 121]. Разновидностями ГКР-метода являются методы ГКР с метками, усиливающими сигнал [120] или с зондами, увеличивающими селективность анализа [102]. Помимо зондов на основе нуклеиновых кислот, по аналогии с отработанными методами иммобилизации, применяемыми в направленной доставке лекарственных препаратов [122–126], используются белковые и пептидные векторы. При связывании бактерий с поверхностью ГКР-субстрата в качестве зондов могут выступать полноразмерные антитела или их фрагменты (например, scFv или Fab), пептиды бактериофагов, и другие векторы [115, 117, 118]. В качестве альтернативы моноклональным антителам для связывания наночастиц золота с бактериями могут использоваться аналоги антител [127, 128].

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Методы КР и ГКР, являясь достаточно чувствительными, предъявляют особые требования к проведению анализа. Так, анализируемые спектры не должны быть загрязнены сигналами от антибиотика [96, 111, 129]. Однако, при анализе единичных клеток отмывка от среды, содержащей антибиотик, может и не применяться [95, 97, 130]. Для получения библиотек КР-спектров зачастую используют родственные штаммы чувствительные и резистентные к определенным антибиотикам [96, 98, 103] или в виде клинических изолятов [105, 106, 113, 121].

В качестве аналита для ГКР могут использоваться как цельные бактериальные клетки, так и межклеточный матрикс. Как и в случае ранее описанных подходов, комбинация КР и ГКР с микрофлюидными системами, позволяет проводить последовательное измерение большого количества образцов в индивидуальных микро-ячейках [118, 119].

Ввиду высокой чувствительности данных методов во многих работах используются методы статистической обработки и/или машинного обучения. Для идентификации и группировки спектров – например, метод главных компонент и линейный дискриминантный анализ позволяют различать виды бактерий [131], метаболическое состояние [100] и жизнеспособность [101]. Методы статистической обработки позволяют классифицировать массивы схожих спектров, содержащих пики различной интенсивности в одних и тех же областях.

К настоящему времени не выработано стандартов анализа бактерий с помощью КР. Вопрос чувствительности (минимальное количество клеток, минимальная концентрация метаболитов и т.д.) также остается открытым, хотя в отдельных работах предпринимались попытки определить эти значения:  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл при анализе суспензий [116]; 44–128 единичных клеток при микроскопии с КР-спектрометрией [95]; минимальная концентрация аденина и гипоксантина составила  $10^{-6}$  М при ГКР с внутренним стандартом (сопоставима с ВЭЖХ-МС) и  $2 \cdot 10^{-4}$  М без внутреннего стандарта [108].

Сравнение различных типов ГКР-спектропии затруднительно из-за большого количества вариаций: тип прибора (микроскоп или спектрометр), тип субстрата (твердотельный или коллоидный), род исследуемых бактерий, механизм действия антибиотиков и т.д. Однако, в работах группы Гуковского [111, 132] проводился отдельный анализ супернатанта культуры бактерий и осадка клеток: анализ супернатанта отличался

**Таблица 1. Изменения наиболее характерных линий в КР- и ГКР-спектрах бактерий, используемые для анализа чувствительности к антибиотикам**

Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup>	Биомаркеры	Изменение интенсивности при действии антибиотика
650–670	Цистин (C–S), белки (C–C), гуанин	Уменьшение [101, 129]
730–740	Аденин, гипоксантин (гетероциклы)	Увеличение (ампициллин) [111, 119, 132] уменьшение (канамицин, хлорамфеникол, тетрациклин [118], метициллин, оксациллин [129])
959	Белки	Уменьшение [101]
994–1006	Фенилаланин (цикл)	Увеличение [101]
1349	Аденин, гуанин (C–N)	Уменьшение [101]
1440–1470	Белки, липиды (–CH <sub>2</sub> –)	Уменьшение [101]
1570–1580	Белки	Зависит от бактерий и антибиотика, возможна калибровка по второстепенной полосе [104]

большой скоростью и чувствительностью, а анализ осадка был более информативен в отношении доли резистентных/восприимчивых бактерий. Другая группа установила воспроизводимость ГКР-спектров одного штамма бактерий в разных поколениях [131], но также отметила сильную зависимость спектров от концентрации клеток, количества отмывок и фазы роста [100, 131].

В таблице 1 приведены координаты пиков, наиболее часто используемых при идентификации бактерий методами КР и ГКР.

Стоит отметить, что почти во всех перечисленных в данном обзоре исследованиях методы КР и ГКР отрабатывались на монокультурах клеток или на клинических изолятах; ни один из подходов не был протестирован на поликультуре бактерий (например, выращенной из смыва со слизистых оболочек). Также методика не отрабатывалась на смешанных культурах (например, состоящих из двух-трех одинаково восприимчивых или одинаково резистентных штаммов). На данный момент КР/ГКР-методы анализа антибиотикорезистентности находится на начальной стадии (пробные эксперименты), и, несмотря на наличие экспериментальных установок [116, 118, 119], не испытывались в реальных клинических условиях.

Что касается сравнения со стандартными методами анализа антибиотикорезистентности, в большинстве работ о подобных сравнениях не упоминается. Как правило, метод отрабатывается на паре штаммов, один из которых принят за «восприимчивый», другой за «резистентный» (например, резистентность достигается путем плазмидной модификации).

Среди работ, в которых методика ГКР-анализа сравнивалась со стандартными методами анализа антибиотикорезистентности, стоит выделить работу Zhang [101]. В данной работе устойчивость бактерий к антибиотикам вырабатывалась путем отбора и культивации активных клеток после инкубации с антибиотиком в течение нескольких бактериальных поколений. Каждое поколение было исследовано на восприимчивость к антибиотикам несколькими методами: минимальная ингибирующая концентрация, предотвращающая мутации концентрация, тест Кирби-Бауэра, ПЦР и метод ГКР. Рассмат-

ривались бактерии *S. Aureus* на предмет устойчивости к оксациллину и цефазолину. В работе Liu [129] основанные на ГКР методы оценки чувствительности к антибиотикам и минимальной ингибирующей концентрации сравнивали со стандартными методами, основанными на выращивании бактерий или на разбавлении.

Таким образом, при разработке КР и ГКР методов анализа следует учитывать механизм действия исследуемого антибиотика, поскольку этот фактор напрямую влияет на конкретные различия в спектрах восприимчивых и резистентных штаммов; использование внутренних стандартов при анализе методом ГКР позволяет увеличить чувствительность системы к конкретным метаболитам в 10–100 раз; более информативным является анализ отдельных фракций бактериальной культуры; применение методов статистической обработки и машинного обучения данных может быть полезным для категоризации спектров. Как правило, методы КР- и ГКР могут успешно использоваться для демонстрации различий в метаболизме заведомо восприимчивых и резистентных штаммов бактерий под действием антибиотика. Отдельные исследования подтверждают совпадение результатов тестирования на резистентность, полученных при помощи ГКР и полученных стандартными методами.

Резюмируя, можно заключить следующее:

1. КР и ГКР спектроскопия являются достаточно оперативными методами при определении МИК и АСТ – в зависимости от чувствительности культуры к антибиотику анализ может занимать от 1 до 8 часов; результаты исследований МИК и АСТ, проведенных с использованием методов, основанных на ГКР, совпадают с результатами, полученными в соответствии со стандартными методами (в рамках работ, в которых такое сравнение проводилось).

2. Использование протоколов или внутренних стандартов позволяет определять чувствительность к антибиотикам как изолятов, так и смешанных культур.

3. Благодаря очень высокой чувствительности методов и вариабельности получаемых спектров, КР и ГКР спектроскопия применима для идентификации как чистых изолятов, так и, потенциально, для определения состава смешанных культур.

4. В качестве аналита могут выступать бесклеточные жидкости (среды, буферы, вода), содержащие метаболиты, суспензии клеток, клеточные осадки, и даже единичные клетки.

5. В случае ГКР спектроскопии потенциальными недостатками можно считать чувствительность к загрязнениям и некоторую сложность пробоподготовки в случае определенных протоколов; кроме того, при большом количестве анализируемых образцов, учитывая ограниченную вариабельность спектров, предпочтительным является применение методов *in silico* категоризации полученных данных.

## **V. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ И АНАЛИЗА РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

MALDI-TOF MS системы получили широкое распространение в клинических лабораториях для идентификации бактериальных штаммов, в том числе наиболее распространенные системы MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) и VITEK MS (bioMérieux) [133–135], благодаря наличию обширных баз данных, содержащих MS профили отпечатков зарядов различных штаммов, а также высокой скорости, дешевизне расходников и чувствительности метода [136–139]. Однако использование масс-спектрометрии для количественного определения чувствительности к антибиотикам значительно менее

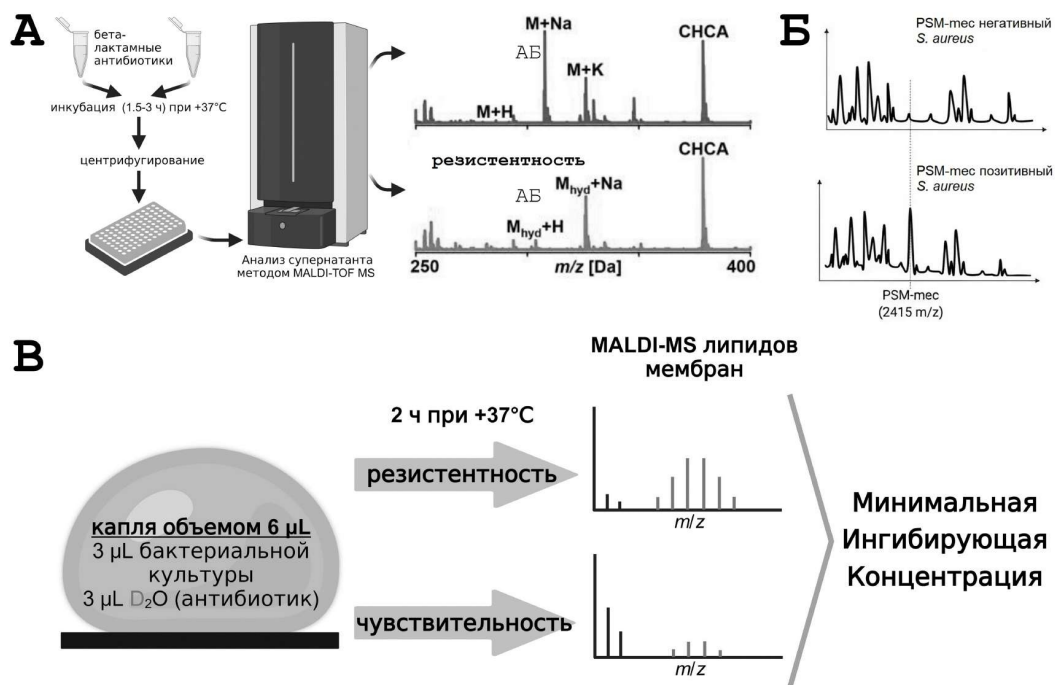


Рис. 5. А. Обнаружение продуцентов β-лактамазы с помощью MALDI-TOF MS на основе гидролиза β-лактамного кольца [140].

Б. Различия штаммов MRSA (низ) и MSSA (верх) на основе присутствия PSM-мec [140].

В. Анализ резистентности с использованием метода Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay (DOT-MGA) [184].

распространено. Такая оценка обычно опирается на прямой и косвенный анализ факторов резистентности, а также факторов, коррелирующих с ними, и может быть условно разделена на 3 группы подходов: анализ продуктов инактивации антибиотиков (рисунок 5 А); анализ непосредственных факторов резистентности или факторов, с ней коррелирующих (рисунок 5 Б); прямое сравнение профилей MS спектров бактерий, культивированных в присутствии и отсутствии антибиотиков.

Вместе с тем, необходимо отметить, что примеры применения методов MS, выявление детерминант антибиотикорезистентности бактериальных изолятов, связанных с изменением проницаемости клеточной стенки и мембраны, в литературе отсутствуют, что ограничивает их практическую применимость в клинической диагностике, поскольку заранее не всегда известно, какой тип устойчивости может быть выявлен у того или иного нового изолята.

### МС-АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ИНАКТИВАЦИИ АНТИБИОТИКОВ

Различные модификации данного подхода основаны на измерении относительного содержания антибиотика или продуктов его метаболизма в составе образца после культивирования: гидролиз, ацилирование, фосфорилирование, тиолирование, перенос нуклеотидильных, АДФ-рибозильных и гликозильных остатков [141]. β-лактамы

антибиотики являются одними из наиболее распространенных антибактериальных препаратов наиболее известными из которых являются пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы. Экспрессия  $\beta$ -лактамаз – один из основных факторов резистентности к данному классу антибиотиков. Гидролиз  $\beta$ -лактамного кольца с предсказуемыми продуктами реакции, делает удобным применение МС-анализа для определения резистентности микроорганизмов к таким препаратам [142]. Например, Ме- и сериновые  $\beta$ -лактамазы приводят к гидролизу  $\beta$ -лактамного кольца, исчезновению пика оригинального антибиотика и появлению сигнала на 18 Да.

Первое успешное применение MALDI-TOF МС для обнаружения резистентности стало результатом наблюдения гидролиза  $\beta$ -лактамного кольца после воздействия бактерий-продуцентов  $\beta$ -лактамазы [143]. Затем был разработан протокол для обнаружения карбапенемаз (ферменты гидролизующие  $\beta$ -лактамные антибиотики: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы) в штамме *B. fragilis* несущем ген *sfIA* – гидролиз эртапенема наблюдали спустя 2,5 часа инкубации только у резистентных штаммов [144]. Hrabak и соавторам понадобилось от 30 до 120 минут для определения гидролиза меропенема различными изолятами *Pseudomonas aeruginosa*; однако, в случае продуцентов ОХА-48- $\beta$ -лактамаз-продуцирующих штаммов инкубация длилась 240 минут [145–146]. Валидированная Vagne и соавторами методика для анализа резистентности штаммов *Aeromonas* к карбапенемам требовала около 75 минут [147]. Sakarikou и коллеги отработали метод позволяющий анализировать резистентность изолятов *K. Pneumoniae* из гемокультур, занимающий от 30 до 180 минут [148]. Схожая методика регистрации гидролизованных форм цефоткасима и цефтазидима в гемокультурах, устойчивых штаммов *Enterobacteriaceae*, была разработана Oviaño и соавторами [149]; среднее время анализа составило 90 минут. Та же группа отработала схожие протоколы, требующие уже 30-минутной инкубации в присутствии антибиотиков [150], для обнаружения изолятов *P. Aeruginosa* и *A. Baumannii* продуцентов карбапенемаз из гемокультур [151].

При кажущейся тривиальности подобного подхода, помимо гидролиза, следует учитывать и влияние матрицы – например,  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота приводит к поглощению диоксида углерода и воды после гидролиза, что приводит к сдвигу пика модифицированного антибиотика на  $-44 m/z$  вместо ожидаемого  $+18 m/z$  [152]. Продуценты же ацил-, фосфо- и нуклеотидил-трансфераз, в отличие от продуцентов  $\beta$ -лактамаз часто приводят к образованию сложных смесей производных антибиотиков, ввиду комплексной природы самих препаратов, получаемых синтетическими и полусинтетическими методами, а также различной специфичностью семейств ферментов [153]. Это приводит к необходимости использования приборов с высокой разрешающей способностью, а также необходимости валидации методик под отдельные пары изолят-антибиотик, что ограничивает их применимость в клинической практике [154].

В завершении подраздела стоит отметить LC-MS (ВЭЖХ-МС) анализ и его вариации – разработано множество протоколов для мониторинга остаточных концентрации антибиотиков в окружающей среде: сточных водах, продуктах животноводства и растениеводства. Однако, данный метод сложно применим для множественного параллельного тестирования резистентности, в отличие от MALDI-TOF масс-спектрометрии, поэтому не описан в рамках данного обзора.



## МС-АНАЛИЗ БИОМАРКЕРОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ИЛИ КОРРЕЛИРУЮЩИХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Другой подход на основе MALDI-TOF МС – это идентификация биомаркеров, являющихся факторами резистентности или ассоциированных с ней. Важным аспектом данного подхода является идентификация детерминант, ответственных за резистентность, которые уже присутствуют в составе изолята (в подавляющем большинстве случаев), а не проявляются в ходе обработки антибиотиком, ввиду чего при разработке протоколов основными факторами, на которые затрачивается время, являются выделение изолятов, а в случаях получения белковых, липидных и фракций нуклеиновых кислот – пробоподготовка. Поэтому, разработчики подобных протоколов зачастую не акцентируют внимание на времени проведения, но сам подход можно считать достаточно быстрым.

В случае высокомолекулярных белков, являющихся факторами резистентности, прямой анализ зачастую затруднен ввиду ряда факторов – низкий уровень экспрессии фермента, вариабельность структуры подтипов белка, необходимость стимуляции экспрессии антибиотиком, вследствие чего усложняется идентификация характеристических пиков, и, как правило, подобные протоколы являются исключением, нежели распространенной практикой [155].

Среди подобных маркеров можно выделить пенициллиназу TEM-1, которой соответствует пик  $m/z$  28972 и  $\beta$ -лактамазу CMY-2, которой соответствует пик  $m/z$  39800, у клинически-значимых штаммов *E.coli* [155, 156]. Примером обнаружения различных подтипов карбапенемазы KPC-2 можно назвать сигналы  $m/z$  28544 и 28718, обнаруженных у резистентных форм *K. Pneumoniae*, выделенных в разных регионах [157].  $\beta$ -лактамаза *A. baumannii* была идентифицирована ( $m/z \sim 40\ 279$  Да) как возможный биомаркер карбапенем-резистентности: из 51 карбапенем-резистентного штамма, 49 показали сигнал на уровне  $40,279 \pm 87$   $m/z$ ; однако, 4 из 15 карбапенем-чувствительных штаммов показали тот же сигнал [158]. Аналогично, сигнал  $m/z$  11,109 Да, являющийся фрагментом фермента, был обнаружен в спектрах 30 из 34 продуцентов карбапенемазы *K. pneumoniae*, но отсутствовал у всех чувствительных изолятов [159].

Помимо ферментов, в качестве белковых факторов резистентности рассматриваются порины – белки, в ряде случаев, способствующие накоплению антибиотиков внутри клеток, а сниженная или отсутствующая экспрессия некоторых из них может быть причиной резистентности. Так, в изоляте *E. coli* ATCC 25922 наблюдается экспрессия поринов OmpA, OmpC, and OmpF, характеризующаяся пиками  $m/z \sim 35000$ , 37000 и 38000; для ряда карбапенем-чувствительных изолятов *K. Pneumoniae* характерна экспрессия OmpA ( $m/z$  36000) и OmpK36 ( $m/z$  38600) [160]. Однако, следует подчеркнуть, что уровень экспрессии поринов хотя и является перспективным, на данном этапе не может считаться однозначным признаком резистентности – необходимы дополнительные исследования.

Помимо анализа непосредственных факторов резистентности, широко распространен анализ биомаркеров ассоциированных с ней. Так, наблюдаются значительные отличия в уровне экспрессии токсина PSM-mec (Phenol-soluble modulins) у метициллин-резистентных (MRSA) и метициллин-чувствительных штаммов *S. aureus* (MSSA) – у MRSA штаммов пик  $m/z$   $2415 \pm 2.00$   $m/z$  PSM-mec присутствует у половины изолятов [161–163].

Схожим образом, резистентные штаммы *B. fragilis* – носители *cfiA* (ген карбапенемазы) можно отличить от чувствительных по набору сдвигов пиков в районе  $m/z$  4,000–

5,500 Да, используя программное обеспечение MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) [164]. Аналогично, все резистентные штаммы *P. aeruginosa* ST175 выявляют два пика  $m/z$  6,911 и 7,359  $m/z$ , которых нет у большинства чувствительных штаммов [165, 166].

Помимо белковых маркеров, хорошую вариабельность между изолятами и высокую воспроизводимость показали различные протоколы анализов мембранных липидов – бактериальные гликолипиды обладают видовыми характеристиками, позволяющими проводить идентификацию с высокой точностью, что позволило использовать подобный подход для определения резистентности к антибиотикам у библиотеки ESKAPE патогенов и колистин-резистентных штаммов *P. aeruginosa* [167].

Так, штаммы *P. aeruginosa*, несущие ген *mcr-1* (колистин-резистентность), показали смещение массы в диапазоне  $m/z$  1,446–1,569, обусловленное добавлением фосфоэтанолamina ( $\Delta m/z$  123) к липиду А (мишень полимиксинов) – ион с массой  $m/z$  1,569 не наблюдался у чувствительных штаммов. У резистентной формы *K. pneumoniae* также была выявлена модификация липида А за счет присоединения арабинозамина ( $\Delta m/z$  131) к терминальной фосфатной группе гексаацетилированного липида А ( $m/z$  1,824), что привело к появлению модифицированной структуры с массой 1,955  $m/z$ . Аналогичным образом, в масс-спектре *M. morganii* масса липида А, модифицированного AraN, смешалась с  $m/z$  1,796 к 1,927 [168]. Аналогичный подход к обнаружению различных производных липида А, и классификации резистентности штаммов на его основе, был продемонстрирован в работах Dortet, Leung и их коллег [169, 170]. Следует подчеркнуть, что протоколы, в ходе которых проходит анализ производных липида А, зачастую требуют предварительной экстракции липидной фракции.

Douthwaite, Stojković и соавторы продемонстрировали возможность определения метилированных форм рРНК, наблюдаемых у метилтрансфераз-экспрессирующих бактерий резистентных к макролидам, стрептограминам, хлорамфениколу, тетрациклинам и аминогликозидам – они наблюдали сдвиг основного пика комплекса рРНК  $m/z$  999 до  $m/z$  1013 при моно-метилировании и до  $m/z$  1027 при ди-метилировании ( $\Delta m/z$  14) [171, 172]. А в работах Cai, Hu и соавторов описана детекция определённых форм поринов ответственных за резистентность к карбепенемам у *K. Pneumoniae* [160, 173]. Два этих, казалось бы, очень разных подхода объединяет необходимость сложной пробоподготовки: выделения рРНК в первом случае и мембранной белковой фракции во втором, что снижает удобство анализа.

Можно отметить, что количество протоколов, задействующих в анализе, относительно простые, стабильные, низкомолекулярные детерминанты с ожидаемыми сдвигами пиков превалирует над техниками определения сложных высокомолекулярных белков, часто являющихся факторами резистентности, ввиду их вариабельности и необходимости индивидуальной адаптации методик от изолята к изоляту.

## СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ СПЕКТРОВ («ОТПЕЧАКОВ») БАКТЕРИЙ

Следующая группа подходов основана сравнении значительной части и полного MS спектра культур, инкубированных в разных условиях. Так, MALDI BioTyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA), основан на прямом сравнении площадей под кривыми (AUCs) спектров бактерий, инкубированных в присутствии или отсутствие антибиотика [174]. В первую очередь, AUCs сравниваются для оценки роста бактерий и определения резистентности [175, 176].

MBT-ASTRA использовали для обнаружения резистентности к гентамицину и ципрофлоксацину у *Enterobacteriaceae*, а также к цефотаксиму, пиперациллин-тазобактаму и ципрофлоксацину у пациентов с сепсисом крови [177]. Sauget и коллеги анализировали изоляты *E. coli*, резистентные к амоксициллину и цефотаксиму [178]. Justesen и соавторы наблюдали явную разницу в относительном росте между чувствительным (ATCC 25285) и резистентным (O18) штаммами *B. fragilis*, после инкубации с клиндамицином, меропенемом или метронидазолом [179]. Во всех вышеописанных случаях результаты чувствительности были получены в течение 4 часов.

В 2023 году Neuenschwander и коллеги применили этот метод для оценки AST и определения МИК для ципрофлоксацина, котримоксазола, фосфомицина, меропенема, цефуроксима и нитрофурантоина в 105 образцах мочи от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей и обнаружили совпадение в результатах анализов в 94.7% между MBT-ASTRA и традиционным AST [180].

Одной из вариаций MBT-ASTRA можно назвать подход на основе анализа смещения пиков МС спектров после инкубации культур в присутствии стабильных изотопов  $^{13}\text{C}$  или  $^{15}\text{N}$  (MBT-RESIST) (рисунок 5 В). В основном используются  $^{13}\text{C}$  или  $^{15}\text{N}$ -содержащие аминокислоты в составе сред для культивирования [174, 181]. Так, Sparbieg и коллеги культивировали MSSA и MRSA в среде, содержащей  $^{13}\text{C}$ -меченый лизин, для анализа чувствительности клинических изолятов *S. aureus* к оксациллину и цефокситину [182]. В результате только 1 из 14 чувствительных штаммов был ошибочно классифицирован как резистентный к оксациллину, и 3 штамма были неправильно классифицированы по чувствительности к цефокситину. Аналогичным образом анализировали чувствительность резистентных штаммов *P. aeruginosa* к меропенему, тобрамицину и ципрофлоксацину после инкубации с  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченным L-лизинном [183].

Другой вариацией данного подхода является инкубация бактериальных культур в микро-каплях непосредственно на подложке для проведения МС анализа (DOT-MGA). Так, были протестированы *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* на резистентность к меропенему, при этом объем подобной микро-капли для каждого отдельного образца составил всего 6 мкл; после 4 часов инкубации чувствительность и специфичность для обоих микроорганизмов достигали 100% [184]; данная методика была апробирована на клинических образцах пациентов с сепсисом крови вызванным меропенем-резистентным и меропенем-чувствительным изолятами *Enterobacteriaceae* [185]. Аналогично, Li и соавторы проанализировали клинические изоляты *A. baumannii*, чувствительные и резистентные к меропенему, при 4-часовой инкубации с различными концентрациями антибиотика [186].

Correa-Martínez и коллеги также подтвердили применимость DOT-MGA на 50 клинических изолятах, включая семейства *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* и *Yersiniaceae* с различными механизмами резистентности к цефалоспорином третьего поколения, и наблюдали синергетический эффект среди четырех цефалоспоринов и ингибиторов  $\beta$ -лактамазы (клавулановой кислоты и/или клоксациллина) [187], подтвердив высокую специфичность метода при определении AST и МИК.

Необходимость в дорогостоящем и громоздком оборудовании для проведения МС анализов для диагностики ограничивает локальную применимость описанных подходов; кроме того, пробоподготовка, особенно при большом количестве образцов, может требовать до нескольких часов работы квалифицированного персонала, ввиду чего, необходима значительная автоматизация протоколов. Однако, методы на основе

MALDI-TOF MS показали значительный потенциал для оперативной, простой и экономически-эффективной идентификации изолятов, анализа AST и определения МИК, о чем свидетельствует внедрение в современную клиническую практику систем MS анализа Biotyper и Vitek.

Резюмируя, можно заключить следующее:

1. MS-анализ является достаточно оперативным методом анализа МИК и AST – в зависимости от изолята, инкубация в присутствии антибиотика может занимать от 30 минут, однако, большинство протоколов требуют нескольких часов.

2. MS-анализ в большей степени подходит для анализа резистентности изолятов, нежели смешанных культур, однако, например, в случае протоколов оценки AST состав культуры не столь значим; стоит отметить, что внедренные в клиническую практику системы Bruker и Vitek позволяют проводить идентификацию культур на основе существующих баз данных протеомных профилей и работать с протоколами для оценки AST и МИК, но, это относится к изолятам.

3. Без учета времени коинкубации с антибиотиками, MS-анализ занимает очень мало времени, пробоподготовка не сложна, а в случае протоколов DOT-MGA возможен быстрый анализ десятков и сотен образцов в микролитровых объемах культур.

4. К текущему моменту в клиническую практику уже внедрен ряд аппаратных и программных решений для автоматизированного анализа антибиотикорезистентности.

5. Недостатками MS-анализа являются необходимость использования дорогостоящего и громоздкого оборудования, квалифицированного персонала, сложность анализа смешанных культур и, как следствие, адаптированность большинства разработанных протоколов под работу с изолятами, а также сложность идентификации изолятов.

## VI. МИКРОСКОПИЯ

В отличие от генотипических методов определения чувствительности к антибиотикам, фенотипические напрямую оценивают, влияет ли антибиотик на рост бактерий, что является основным результатом проведения анализа.

Как упоминалось ранее, методы диск-диффузии и микро-разведения являются золотым стандартом, но зачастую требуют продолжительного времени для получения результата. Современная приборная база, включающая автоматизированные микроскопы, высокочувствительные детекторы (например, CCD) и другие технологии позволяют значительно снизить время проведения таких анализов, что является их логичным развитием. Изображения могут быть получены посредством различным типов микроскопии (световая, флуоресцентная, Рамановская и др.). Анализ изображений при этом можно условно разделить на два направления: «простой» анализ (оптическая плотность среды, автоматическое определение объектов по неравномерному распределению цветового градиента на изображениях для подсчёта количества клеток, колоний, определения размера колоний и морфологии, сравнение количественных показателей при динамическом мониторинге роста культуры, построение зависимостей и т.д.) и «сложный» анализ (обучение и применение сверточных нейронных сетей для статической и динамической категоризации объектов).

Простые методы автоматического анализа изображений на протяжении многих лет применяются в коммерческом и open-source программном обеспечении (TotalLab, ImageJ, Imaris и т.д.) для молекулярной и клеточной биологии, микробиологии и других

областей, не требуют приложения значительных вычислительных мощностей и могут быть относительно легко интегрированы в современные системы анализа.

Так, были разработаны автоматические системы визуального анализа скорости деления на основе оптических микроскопов и CCD камер, позволяющие сократить время анализа AST до 2 дней в случае *M. tuberculosis* вместо 9, и до 3.1 часа вместо 8.5 для *E. coli* [188]; на данный момент статус этих систем не ясен. Подобный подход был использован при разработке одобренных систем MultiPath и mariPOC, которые используются для морфологического анализа отдельных клеток; для идентификации и анализа AST в данных системах используются флуоресцентно меченные иммунно-конъюгаты [189, 190]. Схожая система анализа, также основанная на анализе кинетики роста культур, но комбинированная с пробами для *in situ* гибридизации (FISH), и в строгом смысле являющаяся системой детекции флуоресценции – Accelerate Pheno, была допущена для клинического использования в США для диагностики инфекций мочевыводящих путей и гемокультур; идентификация изолята данной системой занимает около 2 часов, а анализ AST и МИК около 7 часов [191].

Система QuickMIC представляет комбинацию микрофлюидной базы и оптического детектора (микро-фотокамеры со съемкой в режиме time-laps), которая также опирается на анализ кинетики роста культуры в течение 2–5 часов и позволяет проводить идентификацию изолята и определение AST [192]. Система Q-Linea ASTar не адаптирована для идентификации изолятов, но способна определять МИК наряду с AST, и одобрена для применения в некоторых странах [193]. Схожая с предыдущими двумя и основанная на анализе с помощью микроскопии – система oCelloscope, отличительной особенностью которой является способность учитывать морфологическую составляющую культуры, также находится на стадии тестирования для применения в клинической практике [194].

Основанная на высокочувствительном анализе оптической плотности культур путем измерения рассеяния света лазера система BacterioScan 216R Rapid способна предоставить результаты анализа AST примерно за 3 ч, однако, в отличие от предыдущих, не является системой съемки и анализа изображений [195].

Помимо, вышеописанных «классических», в последние годы явно наблюдается рост количества оптических систем анализа микроорганизмов, в которые интегрированы микрофлюидные технологии ввиду возможности реализации значительной многопоточности и низких ресурсо-затрат [196, 197]. Так, Choi и соавторы разработали планшет с микрокамерами, предобработанными антибиотиками в различных концентрациях для внесения бактериальной суспензии в агаре; анализ изображений колоний в таких микрокамерах позволяет оценить AST и МИК изолятов из гемокультур уже через 6 часов [198]. Matsumoto и коллеги описали многоканальный чип, в котором наблюдали рост культур в жидкой среде; на 3 час авторы могли оценить AST, МИК и морфологию клеток в каналах чипа [199]. В другой работе Kim и соавторам удалось сократить время, необходимое для анализа AST до 1–3 часов, а анализ изображений бактерий заключенных в микроканалах чипа показал возможность определения AST менее чем за 10 минут (рисунок 6 Б) [200].

Более сложным, но не менее перспективным является применение методов машинного обучения для анализа изображений. Одним из первых этапов, помимо создания библиотеки изображений, является выявление отдельных клеток (рисунок 6 А) [204]. Иногда эти методы оказываются неточными, например, в случае соприкосновения,

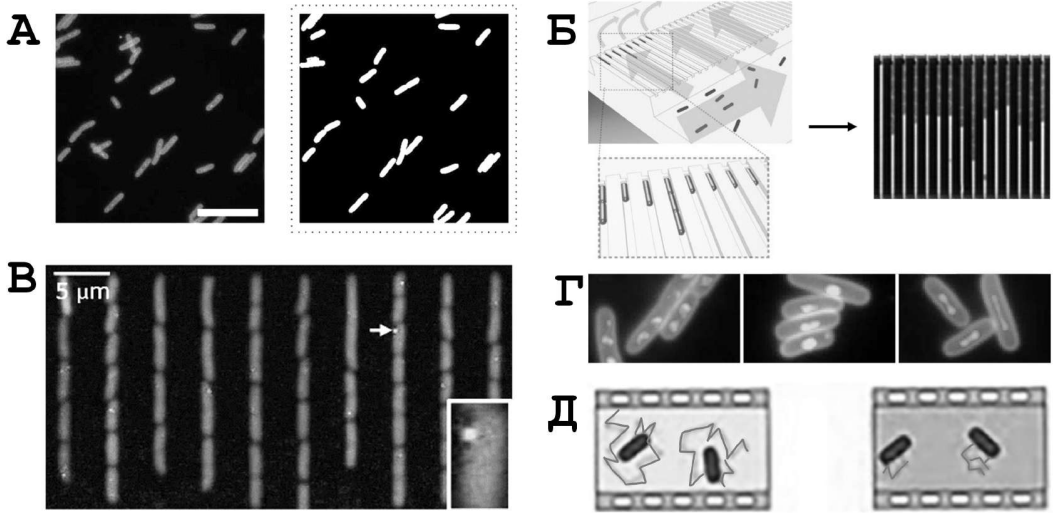


Рис. 6. А. Пример сегментации клеток *E. coli* на флуоресцентной микрофотографии [201].

Б. Схематическое изображение и микрофотография накопления бактериальных клеток в отдельных камерах микрофлюидного чипа [202].

В. Пример детекции возникших мутаций в отдельных клетках [203].

Г. Состояние нуклеоида штамма *E. coli* MG1655. Слева – контроль; центр – ципрофлоксацин-чувствительный изолят; справа – гентамицин чувствительный изолят [201].

Д. Схематическая картина трекинга бактериальных клеток в присутствии (справа) антибиотика и в отсутствии (слева).

деления или перекрытия бактерий, но алгоритмы постоянно улучшаются [205–208]. Так, сверточные нейронные сети R-CNN и U-Net позволяют с высокой точностью сегментировать большие библиотеки изображений бактериальных клеток, считать их, улучшать соотношение сигнал–шум, а также предсказывать наиболее вероятные формы клеток [209–212].

Так, Smith и соавторы продемонстрировали эффективность автоматизированной системы микроскопии с предобученной моделью для быстрого определения типа инфекции. Модель классифицировала бактерии по их морфологии и взаимному расположению: палочки или кокки, характерные для *Staphylococcus*; пары или тяжи, характерные для *Streptococcus*. После обучения на выборке из 100000 изображений алгоритм достиг точности около 95% [213]. Robert и коллеги использовали данный подход для анализа флуоресцентных изображений и детекции мутаций в отдельных клетках в камерах микрофлюидного чипа (рисунок 6 В) [203]. Схожий подход продемонстрирован в работе Zagajewski и соавторов [201] где высокая степень конденсации флуоресцентно-меченного нуклеоида выступала в роли маркера чувствительности к определенным антибиотикам (рисунок 6 Г), а низкая была маркером резистентности. В работе Hayashi-Nishino и коллег была продемонстрирована возможность анализа ТЭМ изображений бактериальных клеток для предсказания AST по микроструктурным повреждениям клеток [214].

Движение бактериальных клеток в растворе также служит маркером их состояния. Первые работы в данной области описывали применение механических сенсоров, в том

числе зондов, используемых в атомной силовой микроскопии. Однако, современные методы фиксации и анализа трекинга сделали применимой в данной области и оптическую микроскопию (рисунок 6 Д). Важно отметить, что такой анализ применим для анализа подвижных и неподвижных форм бактерий, грамм-положительных и грамм-отрицательных, быстро и медленно растущих [215]. Интересно, что фиксация смещения в течение всего 10 секунд после воздействия антибиотика, даже в небольших, субпиксельных диапазонах, уже давала достоверную информацию об AST [216–218]. Таким образом, ряд исследований демонстрируют, что использование автоматизированных систем визуализации, интегрированных как с «простыми» технологиями на основе анализа неоднородностей цветового градиента и флуоресцентных меток, так и со «сложными» технологиями машинного обучения для категоризации изображений и фиксации трекинга, позволяют оперативно проводить подсчёт клеток и колоний, оценивать морфологию и идентифицировать изоляты. Показателем актуальности является ряд вышеописанных систем, которые либо уже введены в клиническую практику, либо находятся на последних стадиях испытаний – почти все из них способны провести анализы в течение 2–6 часов. Использование микрофлюидных технологий, программного обеспечения для анализа изображений предобученными моделями или трекинг клеток способны снизить затраты времени вплоть до 10 минут на анализ, однако, подобные разработки пока находятся на стадии лабораторной исследований.

Резюмируя, можно заключить следующее:

1. По аналогии с импедансометрией, оценка чувствительности к антибиотикам на основе анализа изображений бактериальных клеток в отдельных случаях может занимать от 10 минут, но большинство систем высокой степени готовности ориентированы на периоды от 2 до 6 часов.
2. Анализ изображений подходит для оценки МИК и AST; идентификация культур может осуществляться по форме клеток, присутствию антигенных детерминант, или характеру роста.
3. В случае коммерческих систем, пробоподготовка проста, однако, в большинстве случаев используются проприетарные технологии. При массовом параллельном анализе необходима автоматизация и воспроизводимость процесса, для чего многие разрабатывают микрофлюидные чипы или специфические микропланшеты.
4. Использование иммуно-флуоресцентных зондов повышает специфичность, скорость и чувствительность анализа и решает проблему идентификации в случае смешанных культур, однако повышает стоимость реагентов и оборудования, в ином случае идентификация возможна только по форме клеток.
5. Обучение моделей на основе нейронных сетей требует большого количества исходных изображений – тысячи или десятки тысяч только для одного изолята.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оперативное назначение подходящих антибиотиков на основе идентификации, точного анализа профиля AST и определения МИК общепризнано в клинической практике для лечения широкого круга бактериальных инфекций. Несмотря на недостатки традиционных методов определения AST, их использование широко распространено и является обязательным в клинической практике для получения надежных результатов в соответствии с протоколами EUCAST и CLSI, а также для сравнения с результатами новых, в том числе вышеописанных методов. Методы, основанные на определении

генетических маркеров, являются быстрыми, эффективными, надежными, специфичными и чувствительными, однако обладают такими недостатками как необходимость наличия оборудованной чистой зоны, дорогостоящего оборудования, и вероятность получения ложноположительных результатов при анализе антибиотикорезистентности. Таким образом, разработка новых технологий и подходов потенциально применимых для идентификации бактериальных штаммов, анализа AST и определения МИК является обоснованной. Использование флуоресцентных и люминесцентных зондов, спектроскопии комбинационного рассеяния, импедансометрии, МС анализа, анализа изображений *in silico* и микрофлюидных технологий как в отдельности, так и в комбинации представляет собой ряд перспективных высокоспецифичных систем с малым временем анализа и очень низкими затратами на расходные материалы. Стоит отметить, что в силу разной методологии все описанные подходы являются высокочувствительными и оперативными, и применимы для определения AST и МИК, однако, не все из них одинаково хорошо адаптируемы для идентификации бактерий: наиболее перспективными с этой точки зрения являются методы КР и ГКР, позволяющие различить устойчивые и резистентные штаммы по спектрам; затем следуют методы высокопроизводительного анализа изображений, позволяющие различать форму и взаиморасположение клеток; МС-анализ и импедансометрия, потенциально позволяют проводить идентификацию штаммов на основе спектров, однако, существующие протоколы ориентированы на определение МИК и AST; использование самостоятельных флуоресцентных, люминесцентных меток и красителей для спектрометрии, к сожалению, не позволяет проводить идентификацию клеток, но комбинация с цитометрией или векторными зондами на основе нуклеиновых кислот или белков позволяет решить эту задачу частично или полностью. Часть из этих методов уже валидирована и допущена к использованию в клинической практике, а именно несколько приборов и протоколов МС анализа.

Таким образом, дальнейшая разработка и валидация как существующих, так и новых методов и инструментов для видовой идентификации, анализа AST и определения МИК является необходимой для ускорения постановки диагноза и назначения релевантной терапии, особенно в современных условиях широкого распространения пан-резистентных бактериальных инфекций.

---

Обзор выполнен в рамках проведения фундаментального научного исследования по теме «Создание химико-аналитических систем на основе сверхчувствительных методов нанофотоники для мониторинга биологических рисков и предотвращения связанных с ними угроз» по Государственному заданию от 28.05.2024 г. № 124061300002-9.

## **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., and Giaccone, V. (2017) Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**, 2857–2876.
2. European Medicines Agency (EU body or agency). (2009) The bacterial challenge – time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents, Publications Office of the European Union, [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf).
3. Luyt, C.-E., Bréchet, N., Trouillet, J.-L., and Chastre, J. (2014) Antibiotic stewardship in the intensive care unit, *Critical Care (London, England)*, **18**, 480.
4. Casals-Pascual, C., Vergara, A., and Vila, J. (2018) Intestinal microbiota and antibiotic resistance: Perspectives and solutions, *Human Microbiome Journal*, **9**, 11–15.
5. Nikaido, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria, *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 119–146.
6. O'Connell, K. M. G., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G.P.C., and Spring, D.R. (2013) Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials, *Angewandte Chemie International Edition*, **52**, 10706–10733.
7. Mah, T.-F. (2021) Giving antibiotics an assist, *Science (New York, N.Y.)*, **372**, 1153.
8. Daulaire, N., Bang, A., Tomson, G., Kalyango, J.N., and Cars, O. (2015) Universal Access to Effective Antibiotics is Essential for Tackling Antibiotic Resistance, *The Journal of Law, Medicine & Ethics: A Journal of the American Society of Law, Medicine & Ethics*, **43 Suppl 3**, 17–21.
9. Rood, I.G.H., and Li, Q. (2017) Review: Molecular detection of extended spectrum- $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **89**, 245–250.
10. Górski, A., Jończyk-Matysiak, E., Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., Borysowski, J., Letkiewicz, S., Bagińska, N., and Sfanos, K.S. (2018) Phage Therapy in Prostatitis: Recent Prospects, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1434.
11. Athamanolap, P., Hsieh, K., O'Keefe, C.M., Zhang, Y., Yang, S., and Wang, T.-H. (2019) Nanoarray Digital Polymerase Chain Reaction with High-Resolution Melt for Enabling Broad Bacteria Identification and Pheno-Molecular Antimicrobial Susceptibility Test, *Analytical Chemistry*, **91**, 12784–12792.
12. Maxson, T., Blancett, C.D., Graham, A.S., Stefan, C.P., and Minogue, T.D. (2018) Rapid antibiotic susceptibility testing from blood culture bottles with species agnostic real-time polymerase chain reaction, *PLoS One*, **13**, e0209042.
13. Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M.T.G., Hopkins, K.L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C.U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J.-M., Samuelsen, Ø., and Woodford, N. (2017) The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee, *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **23**, 2–22.
14. Zankari, E., Hasman, H., Kaas, R.S., Seyfarth, A.M., Agersø, Y., Lund, O., Larsen, M.V., and Aarestrup, F.M. (2013) Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**, 771–777.
15. Conzemius, R., Haunold, A., and Barišić, I. (2021) Padlock Probe-Based Generation of DNazymes for the Colorimetric Detection of Antibiotic Resistance Genes, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 13654.

16. Su, M., Satola, S.W., and Read, T.D. (2019) Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance, *Journal of Clinical Microbiology*, **57**, e01405-18.
17. Boolchandani, M., D'Souza, A.W., and Dantas, G. (2019) Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance, *Nature Reviews. Genetics*, **20**, 356–370.
18. Kang, W., Sarkar, S., Lin, Z.S., McKenney, S., and Konry, T. (2019) Ultrafast Parallelized Microfluidic Platform for Antimicrobial Susceptibility Testing of Gram Positive and Negative Bacteria, *Analytical Chemistry*, **91**, 6242–6249.
19. Veses-Garcia, M., Antypas, H., Löffler, S., Brauner, A., Andersson-Svahn, H., and Richter-Dahlfors, A. (2018) Rapid Phenotypic Antibiotic Susceptibility Testing of Uropathogens Using Optical Signal Analysis on the Nanowell Slide, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1530.
20. Wistrand-Yuen, E., Knopp, M., Hjort, K., Koskiniemi, S., Berg, O. G., and Andersson, D. I. (2018) Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure, *Nature Communications*, **9**, 1599.
21. Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J.-M., Hardt, W.-D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D.T., Jenal, U., Levin, B.R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M.-W., Tenson, T., Van Melderen, L., and Zinkernagel, A. (2019) Publisher Correction: Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence, *Nature Reviews. Microbiology*, **17**, 460.
22. Smith, K.P., and Kirby, J.E. (2019) Rapid Susceptibility Testing Methods, *Clinics in Laboratory Medicine*, **39**, 333–344.
23. Benkova, M., Soukup, O., and Marek, J. (2020) Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, *Journal of Applied Microbiology*, **129**, 806–822.
24. Tannert, A., Grohs, R., Popp, J., and Neugebauer, U. (2019) Phenotypic antibiotic susceptibility testing of pathogenic bacteria using photonic readout methods: recent achievements and impact, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 549–566.
25. Khan, Z.A., Siddiqui, M.F., and Park, S. (2019) Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, **9**, 49.
26. Jafari, H., Amiri, M., Abdi, E., Navid, S.L., Bouckaert, J., Jijie, R., Boukherroub, R., and Szunerits, S. (2024) Corrigendum to “Entrapment of uropathogenic E. coli cells into ultra-thin sol-gel matrices on gold thin films: A low cost alternative for impedimetric bacteria sensing” [Biosens Bioelectron. 124-125 (2019) 161-166 DOI: 10.1016/j.bios.2018.10.029], *Biosensors & Bioelectronics*, **254**, 116226.
27. van Belkum, A., Burnham, C.-A.D., Rossen, J.W.A., Mallard, F., Rochas, O., and Dunne, W.M. (2020) Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems, *Nature Reviews. Microbiology*, **18**, 299–311.
28. Zhong, Y., Guo, J., Zheng, Y., Lin, H., and Su, Y. (2024) Metabolomics analysis of the lactobacillus plantarum ATCC 14917 response to antibiotic stress, *BMC Microbiology*, **24**, 229.
29. Mantena, R.K.R., Wijburg, O.L.C., Vindurampulle, C., Bennett-Wood, V.R., Walduck, A., Drummond, G.R., Davies, J.K., Robins-Browne, R.M., and Strugnell, R.A. (2008) Reactive oxygen species are the major antibacterials against Salmonella Typhimurium purine auxotrophs in the phagosome of RAW 264.7 cells, *Cellular Microbiology*, **10**, 1058–1073.
30. Shaffer, C.L., Zhang, E.W., Dudley, A.G., Dixon, B.R.E.A., Guckes, K.R., Breland, E.J., Floyd, K.A., Casella, D.P., Algood, H.M.S., Clayton, D.B., and Hadjifrangiskou, M. (2017) Purine Biosynthesis Metabolically Constrains Intracellular Survival of Uropathogenic Escherichia coli, *Infection and Immunity*, **85**, e00471-16.
31. Chen, L., Liu, R., Li, S., Wu, M., Yu, H., and Ge, Q. (2023) Metabolism of hydrogen peroxide by Lactobacillus plantarum NJAU-01: A proteomics study, *Food Microbiology*, **112**, 104246.

32. Luo, X., Li, M., Zhang, H., Yan, D., Ji, S., Wu, R., and Chen, Y. (2021) Comparative proteomic analysis of three *Lactobacillus plantarum* strains under salt stress by iTRAQ, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **101**, 3457–3471.
33. Zhai, Q., Xiao, Y., Narbad, A., and Chen, W. (2018) Comparative metabolomic analysis reveals global cadmium stress response of *Lactobacillus plantarum* strains, *Metallomics: Integrated Biometal Science*, **10**, 1065–1077.
34. Misba, L., Zaidi, S., and Khan, A. U. (2017) A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **18**, 24–33.
35. Yeo, J.H., Low, J.Q., Begam, N., Leow, W.-T., and Kwa, A.L.-H. (2024) Can flow cytometric measurements of reactive oxygen species levels determine minimal inhibitory concentrations and antibiotic susceptibility testing for *Acinetobacter baumannii*?, *PloS One*, **19**, e0305939.
36. Dwyer, D.J., Belenky, P.A., Yang, J.H., MacDonald, I.C., Martell, J.D., Takahashi, N., Chan, C.T.Y., Lobritz, M.A., Braff, D., Schwarz, E.G., Ye, J.D., Pati, M., Vercurysse, M., Ralifo, P.S., Allison, K.R., Khalil, A.S., Ting, A.Y., Walker, G.C., and Collins, J.J. (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, E2100–2109.
37. Li, H., Zhou, X., Huang, Y., Liao, B., Cheng, L., and Ren, B. (2020) Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 622534.
38. Memar, M.Y., Ghotaslou, R., Samiei, M., and Adibkia, K. (2018) Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: current insights, *Infection and Drug Resistance*, **11**, 567–576.
39. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics, *Cell*, **130**, 797–810.
40. Léger, L., Budin-Verneuil, A., Cacaci, M., Benachour, A., Hartke, A., and Verneuil, N. (2019)  $\beta$ -Lactam Exposure Triggers Reactive Oxygen Species Formation in *Enterococcus faecalis* via the Respiratory Chain Component DMK, *Cell Reports*, **29**, 2184–2191.e3.
41. Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., and Hannig, C. (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm, *Clinical Oral Investigations*, **17**, 841–850.
42. Sani, M.-A., Henriques, S.T., Weber, D., and Separovic, F. (2015) Bacteria May Cope Differently from Similar Membrane Damage Caused by the Australian Tree Frog Antimicrobial Peptide Maculatin 1.1, *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 19853–19862.
43. Barr, D.A., Omollo, C., Mason, M., Koch, A., Wilkinson, R.J., Lalloo, D.G., Meintjes, G., Mizrahi, V., Warner, D.F., and Davies, G. (2021) Flow cytometry method for absolute counting and single-cell phenotyping of mycobacteria, *Scientific Reports*, **11**, 18661.
44. Olivença, F., Pires, D., Silveiro, C., Gama, B., Holtreman, F., Anes, E., and Catalão, M.J. (2024) Ethambutol and meropenem/clavulanate synergy promotes enhanced extracellular and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **68**, e0158623.
45. Gregorchuk, B.S.J., Reimer, S.L., Slipski, C.J., Milner, K.A., Hiebert, S.L., Beniac, D.R., Booth, T.F., Zhanel, G.G., and Bay, D.C. (2022) Applying fluorescent dye assays to discriminate *Escherichia coli* chlorhexidine resistance phenotypes from porin and *mlaA* deletions and efflux pumps, *Scientific Reports*, **12**, 12149.
46. Yang, H.C., Mikami, Y., Imai, T., Taguchi, H., Nishimura, K., Miyaji, M., and Branchini, M. L. (2001) Extrusion of fluorescein diacetate by multidrug-resistant *Candida albicans*, *Mycoses*, **44**, 368–374.
47. Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains, *Annual Review of Biochemistry*, **57**, 101–132.
48. Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Canttonet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R., and Yvon, M. (2009) Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction

- in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*, *Microbiology (Reading, England)*, **155**, 2941–2948.
49. Sund, C.J., McMasters, S., Crittenden, S.R., Harrell, L.E., and Sumner, J.J. (2007) Effect of electron mediators on current generation and fermentation in a microbial fuel cell, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**, 561–568.
50. Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S., and Marshall, N.J. (1995) Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS, *Journal of Immunological Methods*, **179**, 95–103.
51. Paiva, L.C.F., Vidigal, P.G., Donatti, L., Svidzinski, T.I.E., and Consolaro, M.E.L. (2012) Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics, *Micron (Oxford, England: 1993)*, **43**, 497–502.
52. Yanshyna, O., Bialek, M.J., Chashchikhin, O.V., and Klajn, R. (2022) Encapsulation within a coordination cage modulates the reactivity of redox-active dyes, *Communications Chemistry*, **5**, 44.
53. Johno, H., Takahashi, S., and Kitamura, M. (2010) Influences of acidic conditions on formazan assay: a cautionary note, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **162**, 1529–1535.
54. Oeschger, T.M., and Erickson, D.C. (2021) Visible colorimetric growth indicators of *Neisseria gonorrhoeae* for low-cost diagnostic applications, *PLOS ONE*, **16**, e0252961.
55. Liu, Y., Yang, K., Jia, Y., Shi, J., Tong, Z., and Wang, Z. (2020) Cysteine Potentiates Bactericidal Antibiotics Activity Against Gram-Negative Bacterial Persisters, *Infection and Drug Resistance*, **13**, 2593–2599.
56. Zhang, H., Wang, L., Zhang, Z., Lin, J., and Ju, F. (2023) Cost-Efficient Micro-Well Array-Based Colorimetric Antibiotic Susceptibility Testing (MacAST) for Bacteria from Culture or Community, *Biosensors*, **13**, 1028.
57. Crane, B., Hughes, J.P., Rowley Neale, S.J., Rashid, M., Linton, P.E., Banks, C.E., and Shaw, K.J. (2021) Rapid antibiotic susceptibility testing using resazurin bulk modified screen-printed electrochemical sensing platforms, *The Analyst*, **146**, 5574–5583.
58. Hałasa, R., Turecka, K., Mizerska, U., and Krauze-Baranowska, M. (2024) Anti-Helicobacter pylori Biofilm Extracts from *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*, *Pharmaceutics*, **16**, 501.
59. Ikeda, H., Tokonami, A., Nishii, S., Fujita, M., Yamamoto, Y., Sadanaga, Y., and Shiigi, H. (2024) Evaluation of Antibiotic Penicillin G Activities Based on Electrochemical Measurement of a Tetrazolium Salt, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **72**, 253–257.
60. Ince, C., Coremans, J.M.C.C., and Bruining, H.A. (1992) In Vivo NADH Fluorescence, in *Oxygen Transport to Tissue XIV*, (Erdmann, W., and Bruley, D. F., Eds.), pp 277–296, Springer US, Boston, MA.
61. Renault, G., Raynal, E., Sinet, M., Muffat-Joly, M., Cornillault, J., and Pocardalo, J.J. (1985) In situ NADH laser fluorimetry and its application to the study of cardiac metabolism, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **191**, 229–238.
62. Chance, B., Cohen, P., Jobsis, F., and Schoener, B. (1962) Intracellular oxidation-reduction states in vivo, *Science (New York, N.Y.)*, **137**, 499–508.
63. Chance, B. (1976) Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria, *Circulation Research*, **38**, 131–38.
64. Perinbam, K., Chacko, J.V., Kannan, A., Digman, M.A., and Siryaporn, A. (2020) A Shift in Central Metabolism Accompanies Virulence Activation in *Pseudomonas aeruginosa*, *mBio*, **11**, e02730-18.
65. Biener, G., Masson-Meyers, D.S., Bumah, V.V., Hussey, G., Stoneman, M.R., Enwemeka, C.S., and Raicu, V. (2017) Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, **170**, 118–124.

66. Durek, J., Fröhling, A., Bolling, J., Thomasius, R., Durek, P., and Schlüter, O.K. (2016) Non-destructive mobile monitoring of microbial contaminations on meat surfaces using porphyrin fluorescence intensities, *Meat Science*, **115**, 1–8.
67. Mollaeva, M.R., Nikolskaya, E., Beganovskaya, V., Sokol, M., Chirkina, M., Obydenyi, S., Belykh, D., Startseva, O., Mollaev, M.D., and Yabbarov, N. (2021) Oxidative Damage Induced by Phototoxic Pheophorbide a 17-Diethylene Glycol Ester Encapsulated in PLGA Nanoparticles, *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **10**, 1985.
68. Gradova, M.A., Gradov, O.V., Lobanov, A.V., Bychkova, A.V., Nikolskaya, E.D., Yabbarov, N.G., Mollaeva, M.R., Egorov, A.E., Kostyukov, A.A., Kuzmin, V.A., Khudyaeva, I.S., and Belykh, D.V. (2022) Characterization of a Novel Amphiphilic Cationic Chlorin Photosensitizer for Photodynamic Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 345.
69. Faustova, M.R., Nikolskaya, E.D., Zhunina, O.A., Mollaev, M.D., Yabbarov, N.G., Lobanov, A.V., Melnikov, M.Ya., and Severin, E.S. (2018) Polymer nanoparticles loaded with FeCl-tetraphenylporphyrin for binary catalytic therapy of neoplasms, *Russian Chemical Bulletin*, **67**, 359–365.
70. Altmann, A., Eden, M., Hüttmann, G., Schell, C., and Rahmzadeh, R. (2023) Porphyrin-based sensor films for monitoring food spoilage, *Food Packaging and Shelf Life*, **38**, 101105.
71. Neumann, L., Könemund, L., Rohnacher, V., Pucci, A., Johannes, H.-H., and Kowalsky, W. (2021) A2BC-Type Porphyrin SAM on Gold Surface for Bacteria Detection Applications: Synthesis and Surface Functionalization, *Materials (Basel, Switzerland)*, **14**, 1934.
72. Dixneuf, S., Chaireire-Kleiberg, A.-C., Mahé, P., El Azami, M., Kolytcheff, C., Bellais, S., Guyard, C., Védrine, C., Mallard, F., Josso, Q., and Rol, F. (2023) Single-cell scattering and auto-fluorescence-based fast antibiotic susceptibility testing for gram-negative and gram-positive bacteria, *Frontiers in Microbiology*, **14**, 1232250.
73. Grossi, M., Lanzoni, M., Pompei, A., Lazzarini, R., Matteuzzi, D., and Riccò, B. (2008) Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique, *Biosensors & Bioelectronics*, **23**, 1616–1623.
74. Felice, C.J., Valentinuzzi, M.E., Vercellone, M.I., and Madrid, R.E. (1992) Impedance bacteriometry: medium and interface contributions during bacterial growth, *IEEE transactions on bio-medical engineering*, **39**, 1310–1313.
75. Fistenberg-Eden, R and Eden, G. (1984) Impedance microbiology, Wiley Online Library.
76. Ur, A., and Brown D.F.J. (1975) Monitoring of bacterial activity by impedance measurements, New York.
77. Cady, P. (1978) Progress in impedance measurements in microbiology, Springfield, IL.
78. Grossi, M., Pompei, A., Lanzoni, M., Lazzarini, R., Matteuzzi, D., and Ricco, B. (2009) Total Bacterial Count in Soft-Frozen Dairy Products by Impedance Biosensor System, *IEEE Sensors Journal*, **9**, 1270–1276.
79. Silverman, M.P., and Munoz, E.F. (1979) Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants, *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 521–526.
80. Sorrells, K.M. (1981) Rapid Detection of Bacterial Content in Cereal Grain Products by Automated Impedance Measurements, *Journal of Food Protection*, **44**, 832–834.
81. Grossi, M., Lazzarini, R., Lanzoni, M., Pompei, A., Matteuzzi, D., and Riccò, B. (2013) A Portable Sensor With Disposable Electrodes for Water Bacterial Quality Assessment, *IEEE Sensors Journal*, **13**, 1775–1782.
82. Kaur, H., Shorie, M., Sharma, M., Ganguli, A. K., and Sabherwal, P. (2017) Bridged Rebar Graphene functionalized aptasensor for pathogenic E. coli O78:K80:H11 detection, *Biosensors & Bioelectronics*, **98**, 486–493.

83. Colquhoun, K.O., Timms, S., and Fricker, C.R. (1995) Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology, *The Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 635–639.
84. Tyubaeva, P.M., Varyan, I.A., Nikolskaya, E.D., Mollaeva, M.R., Yabbarov, N.G., Sokol, M.B., Chirkina, M.V., and Popov, A.A. (2023) Biocompatibility and Antimicrobial Activity of Electrospun Fibrous Materials Based on PHB and Modified with Hemin, *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, **13**, 236.
85. Yang, Y., Gupta, K., and Ekinci, K.L. (2020) All-electrical monitoring of bacterial antibiotic susceptibility in a microfluidic device, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**, 10639–10644.
86. Yang, D., Jennings, A. D., Borrego, E., Retterer, S.T., and Männik, J. (2018) Analysis of Factors Limiting Bacterial Growth in PDMS Mother Machine Devices, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 871.
87. Simić, M., Babić, Z., Risojević, V., and Stojanović, G. (2017) A novel approach for parameter estimation of Fricke-Morse model using Differential Impedance Analysis, in *CMBEBIH 2017*, (Badnjevic, A., Ed.), pp 487–494, Springer, Singapore.
88. Poinard, C. (2009) About the transmembrane voltage potential of a biological cell in time-harmonic regime., *ESAIM: Proceedings*, **26**, 162–179.
89. Foster, K.R., and Schwan, H.P. (1989) Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, **17**, 25–104.
90. Ghosh, S., Mohamed, Z., Shin, J.-H., Bint E Naser, S.F., Bali, K., Dörr, T., Owens, R.M., Salleo, A., and Daniel, S. (2022) Impedance sensing of antibiotic interactions with a pathogenic *E. coli* outer membrane supported bilayer, *Biosensors and Bioelectronics*, **204**, 114045.
91. Beltagi, A.M. (2003) Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31**, 1079–1088.
92. Fedorchuk, V.A., Puchkovskaya, E.S., Anisimova, L.S., and Slepchenko, G.B. (2005) Use of Voltammetry for Determining Antibiotics Streptomycin and Azitromycin, *Journal of Analytical Chemistry*, **60**, 518–522.
93. Kulapina, E.G., Kulapina, O.I., and Ankina, V.D. (2020) Screen-Printed Potentiometric Sensors Based on Carbon Materials for Determining Cefotaxime and Cefuroxime, *Journal of Analytical Chemistry*, **75**, 231–237.
94. Кулапина Е.Г., Снесарев С.В., Кулапина О.И., and Баринова О.В. (2013) Некоторые проблемы обеспечения избирательности и чувствительности определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах, *Проблемы аналитической химии. Фармацевтический анализ*, **16**, 326.
95. Rousseau, A.N., Faure, N., Rol, F., Sedaghat, Z., Le Galudec, J., Mallard, F., and Josso, Q. (2021) Fast Antibiotic Susceptibility Testing via Raman Microspectrometry on Single Bacteria: An MRSA Case Study, *ACS Omega*, **6**, 16273–16279.
96. Zhang, W., Li, Y., Yao, L., Wu, F., Chen, C., Zhou, L., Zheng, B., Wang, P., and Hong, W. (2021) Rapid antimicrobial susceptibility testing by stimulated Raman scattering metabolic imaging and morphological deformation of bacteria, *Analytica Chimica Acta*, **1168**, 338622.
97. Yi, X., Song, Y., Xu, X., Peng, D., Wang, J., Qie, X., Lin, K., Yu, M., Ge, M., Wang, Y., Zhang, D., Yang, Q., Wang, M., and Huang, W.E. (2021) Development of a Fast Raman-Assisted Antibiotic Susceptibility Test (FRASST) for the Antibiotic Resistance Analysis of Clinical Urine and Blood Samples, *Analytical Chemistry*, **93**, 5098–5106.
98. Tripathy, S., Chavva, S., Coté, G.L., and Mabbott, S. (2023) Modular and handheld Raman systems for SERS-based point-of-care diagnostics, *Current Opinion in Biomedical Engineering*, **28**, 100488.
99. Zhou, Q., and Kim, T. (2016) Review of microfluidic approaches for surface-enhanced Raman scattering, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **227**, 504–514.

100. Shen, H., Rösch, P., Thieme, L., Pletz, M.W., and Popp, J. (2023) Comparison of bacteria in different metabolic states by micro-Raman spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, **1277**, 134831.
101. Zhang, P., Fu, Y., Zhao, H., Liu, X., Wu, X., Lin, T., Wang, H., Song, L., Fang, Y., Lu, W., Liu, M., Liu, W., and Zheng, D. (2022) Dynamic insights into increasing antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* by label-free SERS using a portable Raman spectrometer, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **273**, 121070.
102. Skvortsova, A., Trelin, A., Kriz, P., Elashnikov, R., Vokata, B., Ulbrich, P., Pershina, A., Svorcik, V., Gusel'nikova, O., and Lyutakov, O. (2022) SERS and advanced chemometrics – Utilization of Siamese neural network for picomolar identification of beta-lactam antibiotics resistance gene fragment, *Analytica Chimica Acta*, **1192**, 339373.
103. Thrift, W.J., Ronaghi, S., Samad, M., Wei, H., Nguyen, D.G., Cabuslay, A.S., Groome, C.E., Santiago, P.J., Baldi, P., Hochbaum, A.I., and Ragan, R. (2020) Deep Learning Analysis of Vibrational Spectra of Bacterial Lysate for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing, *ACS Nano*, **14**, 15336–15348.
104. Al-Shaebi, Z., Uysal Ciloglu, F., Nasser, M., Kahraman, M., and Aydin, O. (2024) *Staphylococcus Aureus*-Related antibiotic resistance detection using synergy of Surface-Enhanced Raman spectroscopy and deep learning, *Biomedical Signal Processing and Control*, **91**, 105933.
105. Navin, C.V., Tondepu, C., Toth, R., Lawson, L.S., and Rodriguez, J.D. (2017) Quantitative determinations using portable Raman spectroscopy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **136**, 156–161.
106. Ma, X., Sun, X., Wang, H., Wang, Y., Chen, D., and Li, Q. (2018) Raman Spectroscopy for Pharmaceutical Quantitative Analysis by Low-Rank Estimation, *Frontiers in Chemistry*, **6**, 400.
107. Nechaeva, N., Prokopkina, T., Makhaeva, G., Rudakova, E., Boltneva, N., Dishovsky, C., Eremenko, A., and Kurochkin, I. (2018) Quantitative butyrylcholinesterase activity detection by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **259**, 75–82.
108. Cheng, H.-W., Tsai, H.-M., and Wang, Y.-L. (2023) Exploiting Purine as an Internal Standard for SERS Quantification of Purine Derivative Molecules Released by Bacteria, *Analytical Chemistry*, **95**, 16967–16975.
109. Liu, J., Hong, Z., Yang, W., Liu, C., Lu, Z., Wu, L., Foda, M. F., Yang, Z., Han, H., and Zhao, Y. (2021) Bacteria Inspired Internal Standard SERS Substrate for Quantitative Detection, *ACS Applied Bio Materials*, **4**, 2009–2019.
110. Singh, S., Verma, T., Khamari, B., Bulagonda, E.P., Nandi, D., and Umopathy, S. (2023) Antimicrobial Resistance Studies Using Raman Spectroscopy on Clinically Relevant Bacterial Strains, *Analytical Chemistry*, **95**, 11342–11351.
111. Gukowsky, J.C., Yang, T., and He, L. (2022) Assessment of three SERS approaches for studying *E. Coli* O157:H7 susceptibility to ampicillin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **264**, 120239.
112. Hohlefelder, L.S., Stögbauer, T., Opitz, M., Bayerl, T.M., and Rädler, J.O. (2013) Heavy Water Reduces GFP Expression in Prokaryotic Cell-Free Assays at the Translation Level While Stimulating Its Transcription, *BioMed Research International*, **2013**, 592745.
113. Hirai, K., Tomida, M., Kikuchi, Y., Ueda, O., Ando, H., and Asanuma, N. (2010) Effects of Deuterium Oxide on *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*, *The Bulletin of Tokyo Dental College*, **51**, 175–183.
114. Smith, E., and Dent, G. (2005) *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, John Wiley & Sons.
115. Fasolato, C. (2018) Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Biophysical Applications: Using Plasmonic Nanoparticle Assemblies, in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Biophysical Applications: Using Plasmonic Nanoparticle Assemblies*, (Fasolato, C., Ed.), pp 137–139, Springer International Publishing, Cham.

116. Chang, K.-W., Cheng, H.-W., Shiue, J., Wang, J.-K., Wang, Y.-L., and Huang, N.-T. (2019) Antibiotic Susceptibility Test with Surface-Enhanced Raman Scattering in a Microfluidic System, *Analytical Chemistry*, **91**, 10988–10995.
117. Nechaeva, N., Eremenko, A., Kurochkin, I., Boginskaya, I., Afanasiev, K., Ryzhikov, I., and Sedova, M. (2019) Glicated human albumin registration using nanostructured silver substrates films realizing the effect of surface enhanced scattering, *Mendelev*, **4**(4).
118. Huang, H.-K., Cheng, H.-W., Liao, C.-C., Lin, S.-J., Chen, Y.-Z., Wang, J.-K., Wang, Y.-L., and Huang, N.-T. (2020) Bacteria encapsulation and rapid antibiotic susceptibility test using a microfluidic microwell device integrating surface-enhanced Raman scattering, *Lab on a Chip*, **20**, 2520–2528.
119. Liao, C.-C., Chen, Y.-Z., Lin, S.-J., Cheng, H.-W., Wang, J.-K., Wang, Y.-L., Han, Y.-Y., and Huang, N.-T. (2021) A microfluidic microwell device operated by the automated microfluidic control system for surface-enhanced Raman scattering-based antimicrobial susceptibility testing, *Biosensors and Bioelectronics*, **191**, 113483.
120. Bi, L., Wang, X., Cao, X., Liu, L., Bai, C., Zheng, Q., Choo, J., and Chen, L. (2020) SERS-active Au@Ag core-shell nanorod (Au@AgNR) tags for ultrasensitive bacteria detection and antibiotic-susceptibility testing, *Talanta*, **220**, 121397.
121. Evtushenko, E.G., Gavrilina, E.S., Vasilyeva, A.D., Yurina, L.V., and Kurochkin, I.N. (2024) Highly Sensitive Measurement of Horseradish Peroxidase Using Surface-Enhanced Raman Scattering of 2,3-Diaminophenazine, *Molecules*, **29**, 793.
122. Mollaev, M., Gorokhovets, N., Nikolskaya, E., Faustova, M., Zabolotsky, A., Sokol, M., Tereshenko, O., Zhunina, O., Shvets, V., Severin, E., and Yabbarov, N. (2018) Recombinant alpha-fetoprotein receptor-binding domain co-expression with polyglutamate tags facilitates in vivo folding in E. coli, *Protein Expression and Purification*, **143**, 77–82.
123. Sokol, M.B., Yabbarov, N.G., Mollaeva, M.R., Chirkina, M.V., Mollaev, M.D., Zabolotsky, A.I., Kuznetsov, S.L., and Nikolskaya, E.D. (2022) Alpha-fetoprotein mediated targeting of polymeric nanoparticles to treat solid tumors, *Nanomedicine (London, England)*, **17**, 1217–1235.
124. Nikolskaya, E.D., Zhunina, O.A., Yabbarov, N.G., Shvets, V.I., Krugliy, B.I., and Severin, E.S. (2017) Development of target delivery system based on actinomycin class drugs and recombinant alpha-fetoprotein, *Doklady. Biochemistry and Biophysics*, **473**, 148–150.
125. Yabbarov, N., Nikolskaya, E., Sokol, M., Mollaeva, M., Chirkina, M., Seregina, I., Gulyaev, M., Pirogov, Y., and Petrov, R. (2022) Synergetic Enhancement of Tumor Double-Targeted MRI Nano-Probe, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 3119.
126. Sokol, M., Zenin, V., Yabbarov, N., Mollaev, M., Zabolotsky, A., Mollaeva, M., Fomicheva, M., Kuznetsov, S., Popenko, V., Seregina, I., and Nikolskaya, E. (2021) Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with  $\alpha$ -fetoprotein third domain: Sample preparation case study, *Annales Pharmaceutiques Francaises*, **79**, 500–510.
127. Grewal, Y.S., Shiddiky, M.J.A., Spadafora, L.J., Cangelosi, G.A., and Trau, M. (2015) Structural Characterization of Nanoyeast Single-Chain Fragment Variable Affinity Reagents, *The Journal of Physical Chemistry C*, **119**, 12674–12680.
128. Reza, K.K., Sina, A.A.I., Wuethrich, A., Grewal, Y.S., Howard, C.B., Korbie, D., and Trau, M. (2019) A SERS microfluidic platform for targeting multiple soluble immune checkpoints, *Biosensors and Bioelectronics*, **126**, 178–186.
129. Liu, C.-Y., Han, Y.-Y., Shih, P.-H., Lian, W.-N., Wang, H.-H., Lin, C.-H., Hsueh, P.-R., Wang, J.-K., and Wang, Y.-L. (2016) Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surface-enhanced Raman spectroscopic biomarkers, *Scientific Reports*, **6**, 23375.
130. Ren, W., Mao, Y., Li, S., Gao, B., Fu, X., Liu, X., Zhu, P., Shang, Y., Li, Y., Ma, B., Sun, L., Xu, J., and Pang, Y. (2023) Rapid Mycobacterium abscessus antimicrobial susceptibility testing based on antibiotic treatment response mapping via Raman Microspectroscopy, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **22**, 94.



131. Allen, D.M., Einarsson, G. G., Tunney, M.M., and Bell, S.E.J. (2022) Characterization of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Influence of Microbiological Factors on the SERS Spectra, *Analytical Chemistry*, **94**, 9327–9335.
132. Gukowsky, J.C., and He, L. (2022) Development of a portable SERS method for testing the antibiotic sensitivity of foodborne bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, **198**, 106496.
133. Zhu, W., Sieradzki, K., Albrecht, V., McAllister, S., Lin, W., Stuchlik, O., Limbago, B., Pohl, J., and Kamile Rasheed, J. (2015) Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species, *Journal of Microbiological Methods*, **117**, 14–17.
134. Faron, M.L., Buchan, B.W., Hyke, J., Madisen, N., Lillie, J.L., Granato, P.A., Wilson, D.A., Procop, G.W., Novak-Weekley, S., Marlowe, E., Cumpio, J., Griego-Fullbright, C., Kindig, S., Timm, K., Young, S., and Ledebor, N.A. (2015) Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates, *PLoS One*, **10**, e0141350.
135. Lee, W., Kim, M., Yong, D., Jeong, S.H., Lee, K., and Chong, Y. (2015) Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria, *Annals of Laboratory Medicine*, **35**, 69–75.
136. Hou, T.-Y., Chiang-Ni, C., and Teng, S.-H. (2019) Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology, *Journal of Food and Drug Analysis*, **27**, 404–414.
137. Tsuchida, S., Umemura, H., and Nakayama, T. (2020) Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology, *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**, 4775.
138. Florio, W., Tavanti, A., Barnini, S., Ghelardi, E., and Lupetti, A. (2018) Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1097.
139. Choi, E.Y., Han, J.Y., Lee, H., Lee, S.C., Koh, H.J., Kim, S.S., and Kim, M. (2019) Impact of antibiotic resistance of pathogens and early vitrectomy on the prognosis of infectious endophthalmitis: a 10-year retrospective study, *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, **257**, 805–813.
140. Florio, W., Baldeschi, L., Rizzato, C., Tavanti, A., Ghelardi, E., and Lupetti, A. (2020) Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 572909.
141. Wright, G.D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1451–1470.
142. Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., and Schubert, S. (2013) MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms, *Proteomics. Clinical Applications*, **7**, 767–778.
143. Burckhardt, I., and Zimmermann, S. (2011) Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours, *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 3321–3324.
144. Johansson, A., Nagy, E., SÓki, J., and ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections). (2014) Detection of carbapenemase activities of Bacteroides fragilis strains with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Anaerobe*, **26**, 49–52.
145. Hrabák, J., Walková, R., Studentová, V., Chudácková, E., and Bergerová, T. (2011) Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 3222–3227.
146. Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., Zemlicková, H., Jakubu, V., Chudácková, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y., Perry, J. D., Wilkinson, K., and Bergerová, T. (2012) Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser

- desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 2441–2443.
147. Vogne, C., Prod'homme, G., Jaton, K., Decosterd, L. A., and Greub, G. (2014) A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram-negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadrupole tandem mass spectrometry, microarray and PCR, *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **20**, O1106-1112.
148. Sakarikou, C., Ciotti, M., Dolfà, C., Angeletti, S., and Favalli, C. (2017) Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), *BMC microbiology*, **17**, 54.
149. Oviaño, M., Fernández, B., Fernández, A., Barba, M. J., Mouriño, C., and Bou, G. (2014) Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **20**, 1146–1157.
150. Oviaño, M., Gato, E., and Bou, G. (2020) Rapid Detection of KPC-Producing Enterobacterales Susceptible to Imipenem/Relebactam by Using the MALDI-TOF MS MBT STAR-Carba IVD Assay, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 328.
151. Oviaño, M., Spärbier, K., Barba, M.J., Kostrzewa, M., and Bou, G. (2016) Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**, 655–660.
152. Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C., Berrazeg, M., Brunel, J.-M., Drissi, M., Mesli, E., Touati, A., and Rolain, J.-M. (2012) Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *PLoS One*, **7**, e31676.
153. Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., and Connolly, L.E. (2016) Aminoglycosides: An Overview, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**, a027029.
154. Green, K.D., Chen, W., Houghton, J.L., Fridman, M., and Garneau-Tsodikova, S. (2010) Exploring the substrate promiscuity of drug-modifying enzymes for the chemoenzymatic generation of N-acylated aminoglycosides, *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, **11**, 119–126.
155. Camara, J.E., and Hays, F.A. (2007) Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 1633–1638.
156. Espinosa, R.F., Rumi, V., Marchisio, M., Cejas, D., Radice, M., Vay, C., Barrios, R., Gutkind, G., and Di Conza, J. (2018) Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, **148**, 22–28.
157. Yoon, E.-J., Lee, E. H., Hwang, D.H., Lee, H., Baek, J.-H., and Jeong, S.H. (2020) Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by Enterobacterales using MALDI-TOF MS, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **75**, 1174–1181.
158. Chang, K.-C., Chung, C.-Y., Yeh, C.-H., Hsu, K.-H., Chin, Y.-C., Huang, S.-S., Liu, B.-R., Chen, H.-A., Hu, A., Soo, P.-C., and Peng, W.-P. (2018) Direct detection of carbapenemase-associated proteins of *Acinetobacter baumannii* using nanodiamonds coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, **147**, 36–42.
159. Gaibani, P., Galea, A., Fagioni, M., Ambretti, S., Sambri, V., and Landini, M.P. (2016) Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for

- Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 2609–2613.
160. Hu, Y.-Y., Cai, J.-C., Zhou, H.-W., Zhang, R., and Chen, G.-X. (2015) Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, *Frontiers in Microbiology*, **6**, 784.
161. Chatterjee, S.S., Chen, L., Joo, H.-S., Cheung, G.Y.C., Kreiswirth, B.N., and Otto, M. (2011) Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulins PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *PLoS One*, **6**, e28781.
162. Rhoads, D.D., Wang, H., Karichu, J., and Richter, S.S. (2016) The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **86**, 257–261.
163. Schuster, D., Josten, M., Janssen, K., Bodenstein, I., Albert, C., Schallenberg, A., Gajdiss, M., Sib, E., Szekat, C., Kehl, K., Parčina, M., Hischebeth, G.T.R., and Bierbaum, G. (2018) Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci harboring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry, *International journal of medical microbiology: IJMM*, **308**, 522–526.
164. Johansson, Å., Nagy, E., and Sóki, J. (2014) Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Medical Microbiology*, **63**, 1105–1110.
165. Cabrolier, N., Sauget, M., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2015) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones, *Journal of Clinical Microbiology*, **53**, 1395–1398.
166. Mulet, X., García, R., Gayá, M., and Oliver, A. (2019) O-antigen serotyping and MALDI-TOF, potentially useful tools for optimizing semi-empiric antipseudomonal treatments through the early detection of high-risk clones, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **38**, 541–544.
167. Leung, L.M., Fondrie, W.E., Doi, Y., Johnson, J.K., Strickland, D.K., Ernst, R.K., and Goodlett, D.R. (2017) Identification of the ESKAPE pathogens by mass spectrometric analysis of microbial membrane glycolipids, *Scientific Reports*, **7**, 6403.
168. Liang, T., Leung, L.M., Opene, B., Fondrie, W.E., Lee, Y.I., Chandler, C.E., Yoon, S.H., Doi, Y., Ernst, R.K., and Goodlett, D.R. (2019) Rapid Microbial Identification and Antibiotic Resistance Detection by Mass Spectrometric Analysis of Membrane Lipids, *Analytical Chemistry*, **91**, 1286–1294.
169. Dortet, L., Potron, A., Bonnin, R.A., Plesiat, P., Naas, T., Filloux, A., and Larrouy-Maumus, G. (2018) Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria, *Scientific Reports*, **8**, 16910.
170. Leung, C.-H., and Liu, C.-P. (2019) Diabetic status and the relationship of blood glucose to mortality in adults with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia, *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, **52**, 654–662.
171. Douthwaite, S., Jensen, R.L., and Kirpekar, F. (2008) The activity of rRNA resistance methyltransferases assessed by MALDI mass spectrometry, *Methods in Molecular Medicine*, **142**, 223–237.
172. Stojković, V., Noda-Garcia, L., Tawfik, D.S., and Fujimori, D.G. (2016) Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme, *Nucleic Acids Research*, **44**, 8897–8907.
173. Cai, J.C., Hu, Y.Y., Zhang, R., Zhou, H.W., and Chen, G.-X. (2012) Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 2179–2182.

174. Sparbier, K., Schubert, S., and Kostrzewa, M. (2016) MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing?, *Methods (San Diego, Calif.)*, **104**, 48–54.
175. Ceysens, P.-J., Soetaert, K., Timke, M., Van den Bossche, A., Sparbier, K., De Cremer, K., Kostrzewa, M., Hendrickx, M., and Mathys, V. (2017) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Combined Species Identification and Drug Sensitivity Testing in Mycobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, **55**, 624–634.
176. Axelsson, C., Rehnstam-Holm, A.-S., and Nilson, B. (2020) Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Infectious Diseases (London, England)*, **52**, 45–53.
177. Jung, J.S., Popp, C., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., and Schubert, S. (2014) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures, *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 924–930.
178. Sauguet, M., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2018) Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS, *PLoS One*, **13**, e0205603.
179. Justesen, U.S., Acar, Z., Sydenham, T.V., Johansson, Å., and ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections). (2018) Antimicrobial susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* using the MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA), *Anaerobe*, **54**, 236–239.
180. Neuenschwander, F.R., Groß, B., and Schubert, S. (2023) Rapid Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly from Urine Samples of UTI Patients Using MALDI-TOF MS, *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **12**, 1042.
181. Demirev, P.A., Hagan, N.S., Antoine, M.D., Lin, J.S., and Feldman, A.B. (2013) Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **24**, 1194–1201.
182. Sparbier, K., Lange, C., Jung, J., Wieser, A., Schubert, S., and Kostrzewa, M. (2013) MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling, *Journal of Clinical Microbiology*, **51**, 3741–3748.
183. Jung, J.S., Eberl, T., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., and Wieser, A. (2014) Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **33**, 949–955.
184. Idelevich, E.A., Sparbier, K., Kostrzewa, M., and Becker, K. (2018) Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay, *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **24**, 738–743.
185. Idelevich, E.A., Storck, L.M., Sparbier, K., Drews, O., Kostrzewa, M., and Becker, K. (2018) Rapid Direct Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures by the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay, *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e00913-18.
186. Li, M., Liu, M., Song, Q., Xiong, L., Chen, Z., Kang, M., and Xie, Y. (2018) Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex, *Journal of Microbiological Methods*, **153**, 60–65.
187. Correa-Martínez, C.L., Idelevich, E.A., Sparbier, K., Kostrzewa, M., and Becker, K. (2019) Rapid Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) and AmpC  $\beta$ -Lactamases in Enterobacterales: Development of a Screening Panel Using the MALDI-TOF MS-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay, *Frontiers in Microbiology*, **10**, 13.

188. den Hertog, A.L., Menting, S., Smienk, E.T., Werngren, J., Hoffner, S., and Anthony, R.M. (2014) Evaluation of a microcolony growth monitoring method for the rapid determination of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *BMC infectious diseases*, **14**, 380.
189. Choi, J., Yoo, J., Lee, M., Kim, E.-G., Lee, J.S., Lee, S., Joo, S., Song, S.H., Kim, E.-C., Lee, J.C., Kim, H.C., Jung, Y.-G., and Kwon, S. (2014) A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis, *Science Translational Medicine*, **6**, 267ra174.
190. Vakkila, J., Koskinen, J.O., Brandt, A., Muotiala, A., Liukko, V., Soittu, S., Meriluoto, S., Vesalainen, M., Huovinen, P., and Irjala, K. (2015) Detection of Group A *Streptococcus* from Pharyngeal Swab Samples by Bacterial Culture Is Challenged by a Novel *mari*POC Point-of-Care Test, *Journal of Clinical Microbiology*, **53**, 2079–2083.
191. Doern, C.D. (2018) The Slow March toward Rapid Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing: Are We There Yet?, *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e01999-17.
192. Malmberg, C., Yuen, P., Spaak, J., Cars, O., Tängdén, T., and Lagerbäck, P. (2016) A Novel Microfluidic Assay for Rapid Phenotypic Antibiotic Susceptibility Testing of Bacteria Detected in Clinical Blood Cultures, *PLoS One*, **11**, e0167356.
193. Banchini, I., Borgatti, E.C., Foschi, C., Lazzarotto, T., and Ambretti, S. (2024) Evaluation of an automated rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing (AS*Tar*, Q-linea AB) applied directly on blood cultures bottles positive for Gram-negative pathogens, *The New Microbiologica*, **47**, 107110.
194. Fredborg, M., Rosenvinge, F.S., Spillum, E., Kroghsbo, S., Wang, M., and Sondergaard, T.E. (2015) Rapid antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates by digital time-lapse microscopy, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **34**, 2385–2394.
195. Montgomery, S., Roman, K., Ngyuen, L., Cardenas, A. M., Knox, J., Tomaras, A.P., and Graf, E.H. (2017) Prospective Evaluation of Light Scatter Technology Paired with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, **55**, 1802–1811.
196. Reece, A., Xia, B., Jiang, Z., Noren, B., McBride, R., and Oakey, J. (2016) Microfluidic techniques for high throughput single cell analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, **40**, 90–96.
197. Murray, C., Adeyiga, O., Owsley, K., and Di Carlo, D. (2015) Research highlights: microfluidic analysis of antimicrobial susceptibility, *Lab on a Chip*, **15**, 1226–1229.
198. Choi, J., Jeong, H.Y., Lee, G.Y., Han, S., Han, S., Jin, B., Lim, T., Kim, S., Kim, D.Y., Kim, H.C., Kim, E.-C., Song, S. H., Kim, T. S., and Kwon, S. (2017) Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis, *Scientific Reports*, **7**, 1148.
199. Matsumoto, Y., Sakakihara, S., Grushnikov, A., Kikuchi, K., Noji, H., Yamaguchi, A., Iino, R., Yagi, Y., and Nishino, K. (2016) A Microfluidic Channel Method for Rapid Drug-Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One*, **11**, e0148797.
200. Kim, S.C., Cestellos-Blanco, S., Inoue, K., and Zare, R.N. (2015) Miniaturized Antimicrobial Susceptibility Test by Combining Concentration Gradient Generation and Rapid Cell Culturing, *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **4**, 455–466.
201. Zagajewski, A., Turner, P., Feehily, C., El Sayyed, H., Andersson, M., Barrett, L., Oakley, S., Stracy, M., Crook, D., Nellåker, C., Stoesser, N., and Kapanidis, A.N. (2023) Deep learning and single-cell phenotyping for rapid antimicrobial susceptibility detection in *Escherichia coli*, *Communications Biology*, **6**, 1164.
202. Baltekin, Ö., Boucharin, A., Tano, E., Andersson, D.I., and Elf, J. (2017) Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 9170–9175.

203. Robert, L., Ollion, J., Robert, J., Song, X., Matic, I., and Elez, M. (2018) Mutation dynamics and fitness effects followed in single cells, *Science (New York, N.Y.)*, **359**, 1283–1286.
204. Su, H., Yin, Z., Huh, S., and Kanade, T. (2013) Cell segmentation in phase contrast microscopy images via semi-supervised classification over optics-related features, *Medical Image Analysis*, **17**, 746–765.
205. Nath, S.K., Palaniappan, K., and Bunyak, F. (2006) Cell segmentation using coupled level sets and graph-vertex coloring, *Medical image computing and computer-assisted intervention: MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, **9**, 101–108.
206. Manifold, B., Thomas, E., Francis, A.T., Hill, A.H., and Fu, D. (2019) Denoising of stimulated Raman scattering microscopy images via deep learning, *Biomedical Optics Express*, **10**, 3860–3874.
207. Manifold, B., Men, S., Hu, R., and Fu, D. (2021) A Versatile Deep Learning Architecture for Classification and Label-Free Prediction of Hyperspectral Images, *Nature Machine Intelligence*, **3**, 306–315.
208. Moen, E., Bannon, D., Kudo, T., Graf, W., Covert, M., and Van Valen, D. (2019) Deep learning for cellular image analysis, *Nature Methods*, **16**, 1233–1246.
209. He, K., Gkioxari, G., Dollár, P., and Girshick, R. (2018, January 24) Mask R-CNN, arXiv.
210. Ronneberger, O., Fischer, P., and Brox, T. (2015, May 18) U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, arXiv.
211. Kong, Y., Li, H., Ren, Y., Genchev, G. Z., Wang, X., Zhao, H., Xie, Z., and Lu, H. (2020) Automated yeast cells segmentation and counting using a parallel U-Net based two-stage framework, *OSA Continuum*, **3**, 982–992.
212. Ghiasi, G., Lin, T.-Y., and Le, Q. V. (2018, October 30) DropBlock: A regularization method for convolutional networks, arXiv.
213. Smith, K. P., Kang, A. D., and Kirby, J. E. (2018) Automated Interpretation of Blood Culture Gram Stains by Use of a Deep Convolutional Neural Network, *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e01521-17.
214. Hayashi-Nishino, M., Aoki, K., Kishimoto, A., Takeuchi, Y., Fukushima, A., Uchida, K., Echigo, T., Yagi, Y., Hirose, M., Iwasaki, K., Shin'ya, E., Washio, T., Furusawa, C., and Nishino, K. (2022) Identification of Bacterial Drug-Resistant Cells by the Convolutional Neural Network in Transmission Electron Microscope Images, *Frontiers in Microbiology*, **13**, 839718.
215. Venturelli, L., Harrold, Z. R., Murray, A. E., Villalba, M. I., Lundin, E. M., Dietler, G., Kasas, S., and Foschia, R. (2021) Nanomechanical bio-sensing for fast and reliable detection of viability and susceptibility of microorganisms, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **348**, 130650.
216. Willaert, R. G., Vanden Boer, P., Malovichko, A., Alioscha-Perez, M., Radotić, K., Bartolić, D., Kalauzi, A., Villalba, M. I., Sanglard, D., Dietler, G., Sahli, H., and Kasas, S. (2020) Single yeast cell nanomotions correlate with cellular activity, *Science Advances*, **6**, eaba3139.
217. Radonicic, V., Yvanoff, C., Villalba, M. I., Devreese, B., Kasas, S., and Willaert, R. G. (2023) Single-Cell Optical Nanomotion of *Candida albicans* in Microwells for Rapid Antifungal Susceptibility Testing, *Fermentation*, **9**, 365.
218. Villalba, M. I., Rossetti, E., Bonvallat, A., Yvanoff, C., Radonicic, V., Willaert, R. G., and Kasas, S. (2023) Simple optical nanomotion method for single-bacterium viability and antibiotic response testing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **120**, e2221284120.