**Использование ГКР-активных мембран для single-cell анализа антибиотикорезистентности**

***Мушенков В.А., Завьялова Е.Г.***

*Студент, 5 курс специалитета*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

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

Устойчивые к антибиотикам патогены представляют собой одну из наиболее важных проблем современной медицины. Растущие объемы использования антибиотиков во многих сферах деятельности приводят к появлению устойчивости у широкого спектра штаммов микроорганизмов и соответственно снижению эффективности применяемых препаратов. Большой проблемой также является то, что новые классы антибиотиков открывать очень трудно: так, последний класс антибиотиков, пригодных для использования в медицине, был открыт в 1987 году, с тех пор на рынок не вышло ни одного нового класса препаратов. Развитие резистентности текущими темпами приведёт к тому, что устойчивые инфекции, как ожидается [1], станут наиболее частой причиной смертности.

Исследование устойчивости бактериальных штаммов к антибиотикам является важнейшим шагом при лечении резистентных инфекций. К сожалению, часто применяются эмпирические схемы лечения, не основанные на данных об устойчивости патогена. Это часто приводит либо к неэффективности терапии, либо к необоснованному использованию антибиотиков резерва, что повышает риск возникновения устойчивости к ним. Одна из причин выбора таких схем лечения – длительность проведения тестов на устойчивость к антибиотикам. Наиболее широко применяемые методы – культуральные, требующие роста колоний клеток, что занимает в среднем несколько суток для получения результата. «Быстрые» геномные или протеомные методы не имеют достаточной универсальности и часто применимы лишь к конкретному механизму устойчивости конкретного штамма.

Ранее нами был разработан быстрый метод определения антибиотикорезистентности, основанный на оценке влияния антибиотика на метаболизм клетки при помощи МТТ теста. Образующийся в ходе реакции формазан определяли методом рамановской спектроскопии, позволившей проводить измерения с высокой специфичностью без пробоподготовки и выделения формазана из реакционной смеси. Время анализа составляет не более 2 часов, с пределом обнаружения в 1\*107 КОЕ/мл (Колониеобразующих единиц). Данная концентрация бактериальных клеток достаточно высока для клинических образцов, таким образом невозможно непосредственное измерение образцов без подращивания клеток.

В данной работе предложен способ повышения чувствительности метода при помощи эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) на серебряных наночастицах. Образцы культур после обработки формазаном фильтруются через мембраны с напыленными наночастицами, при этом на мембранах задерживаются клетки и свободно плавающие кристаллы формазана. За счет эффекта ГКР минимально определяемая на рамановском спектрометре концентрация бактерий снизилась до 1\*103 КОЕ/мл. Усиление сигнала оказалось достаточно высоким для измерения спектра формазана от отдельной клетки при помощи рамановского микроскопа, таким образом чувствительность метода была повышена вплоть до анализа единичных клеток. При действии антибиотика интенсивность полос формазана единичных клеток также снижается, позволяя оценить устойчивость образца к антибиотику.

1. Bassetti M. et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach //Intensive care medicine. 2017. Vol. 43. P. 1464-1475.