

# РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ – СОВРЕМЕННАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.19  
УДК 579:578.8:616–022–073.584  
Поступила 26.09.2018 г.

© **Б.Г. Андрюков**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии<sup>1</sup>; профессор департамента фундаментальных наук<sup>2</sup>;  
**А.А. Карпенко**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биофизики клетки<sup>3</sup>;  
**Е.В. Матосова**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии<sup>1</sup>;  
**И.Н. Ляпун**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, ул. Сельская, 1, Владивосток, 690087;

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, ул. Суханова, 8, Владивосток, 690091;

<sup>3</sup>Институт биологии моря Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, ул. Пальчевского, 17, Владивосток, 690041

Изучение и индикация возбудителей инфекционных болезней являются важными и актуальными задачами, прогресс в решении которых может быть достигнут только при условии использования различных подходов. Современные диагностические технологии, основанные на иных биофизических принципах детекции, позволяют обеспечить исследование сложных биологических субстратов с высокой степенью аналитической надежности. Рамановская спектроскопия, основанная на выявлении молекулярной структуры, уже давно зарекомендовала себя в качестве надежного аналитического инструмента в различных областях науки и техники.

Рассмотрены современные достижения микробиологии с использованием метода рамановской спектроскопии и его ограничения, а также наиболее важные мировые тенденции применения этой диагностической технологии для изучения и индикации возбудителей бактериальных и вирусных инфекций.

**Ключевые слова:** бактерии; вирусы; индикация; рамановская спектроскопия; современные диагностические технологии.

**Как цитировать:** Andryukov B.G., Karpenko A.A., Matosova E.V., Lyapun I.N. Raman spectroscopy as a modern diagnostic technology for study and indication of infectious agents (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 161–174, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.19>

## English

## Raman Spectroscopy as a Modern Diagnostic Technology for Study and Indication of Infectious Agents (Review)

**B.G. Andryukov**, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology<sup>1</sup>; Professor, Department of Fundamental Sciences<sup>2</sup>;

**A.A. Karpenko**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cell Biophysics<sup>3</sup>;

**E.V. Matosova**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology<sup>1</sup>;

**I.N. Lyapun**, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 1 Selskaya St., Vladivostok, 690087, Russia;

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, 8 Sukhanova St., Vladivostok, 690091, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Marine Biology of the A.V. Zhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology, 17 Palchevskogo St., Vladivostok, 690041, Russia

The study and detection of causative agents of infectious diseases are an important and urgent task, the progress of which can be achieved only if different approaches are used. Current diagnostic technologies based on different biophysical detection principles allow

**Для контактов:** Андрюков Борис Георгиевич, e-mail: andryukov\_bg@mail.ru

the research of complex biological substrates with a high degree of analytical reliability. Raman spectroscopy based on the discovery of molecular structure has long established itself as a reliable analytical tool in various fields of science and technology.

The purpose of this report is to review current achievements in microbiology using the Raman spectroscopy, demonstration its limitations, as well as the most important world trends in the application of this diagnostic technology for the study and indication of pathogens of bacterial and viral infections.

**Key words:** bacteria; viruses; indication; Raman spectroscopy; modern diagnostic technologies.

## Введение

Нарастающая антибиотикорезистентность бактерий вызывает все большую тревогу в современном обществе [1–3]. Эта проблема имеет актуальное значение для глобального здравоохранения и обуславливает необходимость более быстрой и высокочувствительной индикации возбудителей бактериальных и вирусных инфекций [4]. Помимо решения научных и прикладных задач ранняя и специфическая диагностика становится важнейшим аспектом санитарного и эпидемиологического мониторинга, противодействием биотеррористическим угрозам [5].

Идеальный метод обнаружения инфекционных агентов не должен требовать сложных стадий пробоподготовки, при этом обеспечивать быструю индикацию возбудителя, быть автоматизированным и относительно недорогим. Хотя действующие методы считаются точными, им не хватает необходимой чувствительности и они требуют значительного времени для обнаружения патогенов [6–9]. Например, традиционные методы индикации возбудителей опираются на «золотой стандарт», ориентированный на культивирование бактерий на плотных питательных средах, дифференцирование их в соответствии с основными морфологическими и биохимическими характеристиками. Недостатками микробиологических методов являются их высокая стоимость; длительность (от нескольких дней до нескольких недель), обусловленная скоростью репликации бактериальных клеток; невозможность выявить так называемые устойчивые (дормантные) формы бактерий, которые не растут в обычных условиях (L-формы; жизнеспособные, но некультивируемые состояния; клетки-персистеры) и не выявляются при рутинных бактериологических исследованиях [10–12].

При верификации возбудителей в практике клинической микробиологии используются преимущественно классические методы, основанные на идентификации свойств возбудителей (морфологических, тинкториальных и культуральных). Однако эти методы не учитывают варианты фенотипической изменчивости бактерий, которые могут касаться их биологических свойств и связаны с условиями существования микроорганизмов [13–15]. Идентификация бактерий с помощью бактериологических анализаторов существенно повышает точность традиционных микробиологических методов, однако для их применения требуется выделение чистых культур возбудителя в течение

18–24 ч, наличие дорогого оборудования и расходных материалов [16–18].

Для точной таксономической идентификации на видовом и внутривидовом уровнях рекомендуются тест-системы, основанные на иммунологической верификации возбудителя. Однако эти методы являются непрямыми, их диагностическая ценность зависит от индивидуальных вариаций иммунного ответа, а также генетических мутаций бактерий. Кроме того, к недостаткам методов причисляют достаточно узкий диагностический диапазон, зависящий от наличия спектра антител, что ограничивает возможность их использования для широкого скрининга проб [18].

В настоящее время в лабораторной практике активно внедряются новые эффективные молекулярно-генетические диагностические инструменты: мультипраймерная полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция, основанные на обнаружении сиквенсов отдельных консервативных участков нуклеиновых кислот (РНК или ДНК) микроорганизмов [19–22]. Молекулярно-генетический метод обладает несомненным преимуществом перед классическими микробиологическими методами идентификации возбудителей, обеспечивая быструю (4–5 ч) и точную индикацию возбудителя с высокой чувствительностью и специфичностью. К достоинствам этого метода справедливо относят его универсальность и вероятность выявления как бактериальных, так и вирусных агентов, а также возможность исследовать небольшие по объему пробы, идентифицировать внутриклеточные патогены и дормантные (некультивируемые) формы бактерий [20, 21].

Однако, несмотря на очевидные достоинства, ПЦР-анализ имеет определенные недостатки, среди которых — возможность получения ложноположительного результата при выявлении нуклеиновых кислот в неживых возбудителях [21, 23]. Невозможность с помощью этого метода отличить жизнеспособного возбудителя от неживого накладывает существенные ограничения на его применение для контроля эффективности лечения, связанного с необходимостью выполнения тестовых исследований только после выведения из организма мертвых патогенов, что происходит в течение 4–8 нед [11, 23].

Технологический недостаток молекулярно-генетических методов — достаточно трудоемкая и длительная подготовка образцов. Кроме того, мутации микроорганизмов в консервативной области генома могут стать причиной возникновения ложноотрицательных результатов. И, наконец, целый ряд веществ (гепарин,

ЭДТА, этанол, изопропанол и др.) способны ингибировать полимеразную реакцию, а в процессе проведения ПЦР возможен риск контаминации образцов [11, 21, 23]. Практическое применение этих методов сдерживает необходимость приобретения дорогостоящего оборудования и зависимость от набора тест-систем [9, 20, 21].

В последнее десятилетие для идентификации возбудителя все большую популярность приобретает метод матрично-ассоциированной десорбции/ионизации, особенно в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией — matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Этот метод базируется на масс-спектрометрической детекции микроорганизмов с помощью лазерного излучения на основании выявления генетически детерминированного специфического состава белков и липидов бактериальной клетки [11, 24–26]. Существующие вариации метода, связанные с проведением белкового (MALDI-TOF MS) и липидного профилирования в сочетании с газовой (ГХ-МС) или жидкостной (ЖХ-МС) хроматографией, получают все большее распространение в медицинских и санитарно-гигиенических исследованиях, в том числе в микробиологии для быстрой (в течение нескольких минут), достоверной и эффективной индикации возбудителей инфекционных заболеваний [24]. Однако преимущества MALDI-TOF в скорости индикации ограничиваются необходимостью предварительного выделения чистой культуры микроорганизмов из исследуемых биоматериалов, на что обычно требуется не менее 16–24 ч, а также приобретением дорогостоящего оборудования и разрушением образца в процессе проведения анализа [24–26].

Таким образом, широко используемые традиционные методы обнаружения возбудителей имеют как преимущества, так и недостатки и ограничения [18, 27, 28], что обуславливает необходимость поиска новых и эффективных диагностических инструментов для индикации патогенов с привлечением иных биофизических принципов детекции. Они должны сочетать в себе быстроту диагностики, минимальную пробоподготовку образцов, низкую себестоимость, высокую чувствительность и хорошую воспроизводимость.

В последние годы предметом повышенного внимания в биомедицинских исследованиях стали современные аналитические технологии определения структуры биологических молекул, позволяющие получать информацию о метаболизме возбудителей инфекций. Эти диагностические инструменты, основанные на методах спектроскопии и спектрометрии, дают достаточно много информации из единичного исследования, не приводя к разрушению образца. Среди современных биомедицинских технологий, основанных на ранней индикации возбудителей инфекций посредством повышенной аналитической чувствительности и специфичности, исследователями выделяется рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния (РС) как наиболее привлекательный и перспективный метод ин-

дикации и верификации возбудителей [9, 11, 18, 23, 29].

В данном исследовании приводится обзор современных достижений микробиологии с использованием метода РС, а также наиболее важных мировых тенденций применения этой диагностической технологии для изучения и индикации возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. В качестве источников информации использовались зарубежные базы данных PubMed и Internet Grateful Med v. 2.6, каталоги CAB Health, EDINA и Dialog с глубиной поиска 2010–2018 гг.

## Рамановское рассеяние и SERS-спектроскопия

В основе метода лежит феномен резонансного рамановского (неупругого, комбинационного) рассеяния монохроматического света (resonance Raman scattering — RRS), который был открыт индийскими учеными Ч.В. Раманом и К.С. Кришнаном в 1928 г. Рамановская спектроскопия использует эффект Рамана при взаимодействии лазерного луча с молекулами вещества [11, 15, 23]. С помощью светофильтра из полученного пучка света выделяются рассеянные лучи, которые усиливаются и регистрируются в виде уникального набора спектральных линий, имеющих иную частоту, чем падающий луч [9, 19, 29]. Спектры рассеяния очень чувствительны к природе химических связей как в органических молекулах, так и в неорганических кристаллических решетках. Благодаря этим свойствам рамановское комбинационное рассеяние широко применяется в химии, геологии, экологии, материаловедении, косметологии, криминалистике.

В XXI в. новые технологии усиленной РС показали себя незаменимыми инструментами для биомедицинских научных и прикладных исследований благодаря основным преимуществам метода: неинвазивности, бесконтактности, отсутствию необходимости подготовки пробы, скорости исследования, возможности работы с водными буферными растворами и комбинирования с конфокальной, атомно-силовой и электронной микроскопией [9, 11, 23, 30, 31].

Наблюдаемые в процессе исследования с применением РС основные частотные характеристики являются высокоспецифичными для различных микроорганизмов и функциональных групп внутриклеточных молекул, представляя собой точный индивидуальный «отпечаток пальцев», который способен обеспечивать внутренний «фенотипический профиль» одиночных клеток [32], выявлять экспрессию гена [9, 30], биосинтез соединений [18, 31], характерные субклеточные структуры и включения [9], физиологические состояния [23, 33] или изменения метаболизма [28, 29]. Эта особенность сделала технологию РС очень привлекательной для исследования различных аналитов, включая биологические объекты. Однако низкая интенсивность сигнала на выходе была основной причиной того, что в течение длительного времени метод не получал широкого распространения в биомедицинских исследованиях. И лишь в 90-х годах прошлого века

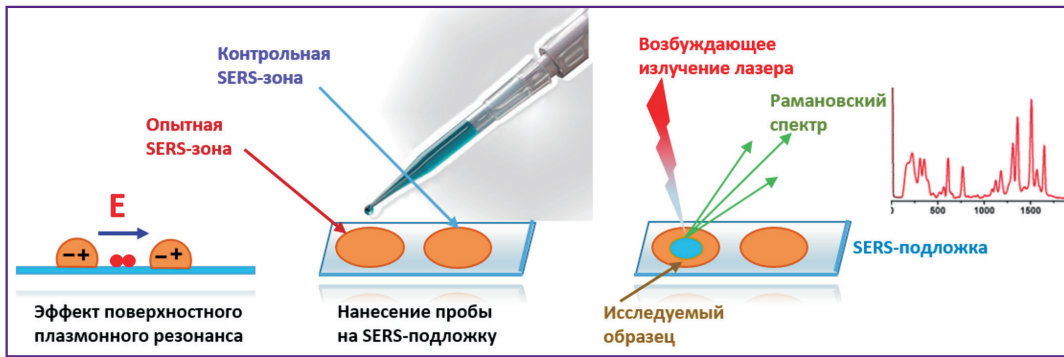


Рис. 1. Спектроскопия поверхностно-усиленного рамановского рассеяния — SERS (рисунок авторов)

после совмещения рамановского спектрометра с конфокальным микроскопом стали возможны регистрация спектров клеток, а также исследование очень малых объектов в пределах  $1 \text{ мкм}^3$ , включая одиночные клетки или их внутриклеточные фрагменты [18, 28, 34].

Современное приложение технологии РС в биологии стимулируется необходимостью снижения нижнего предела обнаружения веществ, в первую очередь — изучения внутриклеточных биомолекул и микроорганизмов, при решении задач биомедицинской диагностики. В начале XXI в. благодаря нанотехнологическим разработкам стал широко применяться самый мощный

способ усиления сигнала — спектроскопия поверхностно-усиленного рамановского рассеяния (surface enhanced Raman scattering — SERS). Метод усиленной РС (рис. 1) основан на использовании SERS-подложек, представляющих собой высокоточные наноструктуры с сорбированными на них в активной области наночастицами серебра или золота размером 10–100 нм. Образующиеся плазмоны значительно увеличивают электрическое поле вокруг металла, резко усиливая интенсивность сигнала (до  $10^{14}$  раз), что позволяет регистрировать вибрационные состояния внутриклеточных молекул (антител, нуклеиновых кислот, белков, липидов), а также вирусов [14, 16, 35, 36]. Таким образом, SERS является аналитическим инструментом, объединяющим специфический молекулярный анализ РС с усиливающим сигналом плазмонных наноструктур [37–39].

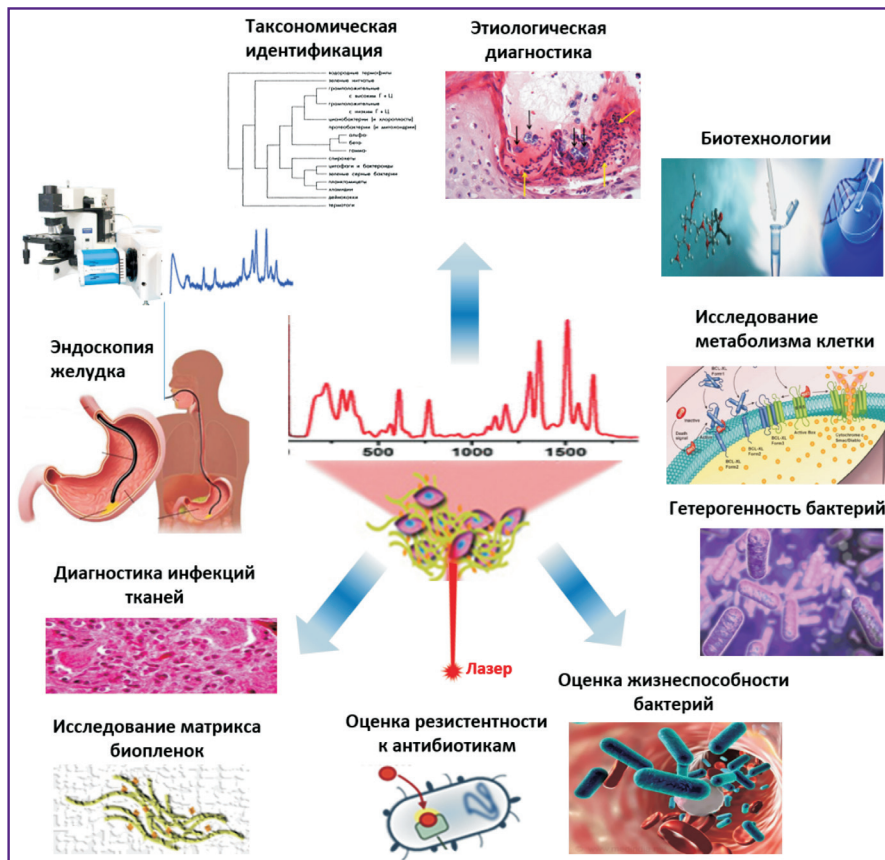


Рис. 2. Применение рамановской спектроскопии в микробиологии (рисунок авторов)

Полученные спектры сравниваются с имеющейся в программном обеспечении базой данных или контрольными спектрами музейных штаммов.

Особая разновидность поверхностно-усиленной РС, в которой для повышения сигнала используется зонд сканирующего зондового микроскопа, получила название спектроскопии локального усиления рамановского рассеяния (tip enhanced Raman scattering — TERS). SERS- и TERS-разновидности, основанные на эффекте плазмонного резонанса, получили общее название — гигантское комбинационное рассеяние — и позволили значительно расширить практическое использование РС, рекомендовать метод в качестве чрезвычайно мощного и универсального инструмента практиче-

ски для всех биологических и медицинских исследований и, в частности, в микробиологии [16, 38, 40, 41] (рис. 2).

За последние несколько лет РС комбинационного рассеяния стала незаменимым диагностическим инструментом для контроля изменений молекулярной структуры бактериальной клетки на основе конкретных сигналов от белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов и неорганических кристаллов в режиме реального времени [41]. Эта технология может использоваться для детекции и индикации микроорганизмов без предварительной пробоподготовки, что делает ее надежным и незаменимым методом для решения многочисленных биомедицинских задач [9, 11, 23, 41].

Например, РС позволяет оценивать внутри- и межвидовые отношения бактерий. Специфические спектры комбинационного рассеяния для каждого типа клеток РС предоставляют дополнительную информацию об их жизнеспособности, статусе, дифференцировке и атипичности, чувствительности к антибиотикам [9, 11, 42, 43]. При исследовании биопленок РС может обнаруживать основные компоненты внеклеточного матрикса и вторичные структуры, не разрушая их, что дает возможность проследить динамику процессов *in vitro* [19, 44]. Небольшое время применения (20–40 мин), высокое разрешение, простота в использовании делают технологию РС и ее усиленные модификации перспективным диагностическим инструментом для идентификации бактерий и вирусов [9, 22, 30].

### РС-совместимые методы для индикации бактерий

Ренессанс РС в биомедицинских исследованиях, наблюдаемый в последние годы, связан с быстротой получения результата (минуты) и высокой специфичностью сигнала комбинационного рассеяния, которые являются важнейшими характеристиками этого метода, имеющего высокий потенциал для обнаружения и выявления бактерий в смешанной культуре. Немаловажное преимущество РС — прижизненное выявление биохимического состава бактерий с возможностью их дальнейших исследований [19, 22, 30]. Как правило, спектральные сигнатуры позволяют отличить грамотрицательные и грамположительные бактерии, поскольку интенсивность рассеяния последних обычно выше во всех диапазонах длин волн [22, 30].

В последние годы установлено, что эффективность индикации, чувствительность метода и воспроизводимость его результатов в значительной мере зависят от состава анализируемого образца и количества присутствующих в нем бактерий, а предел обнаружения опосредуется стратегией изоляции микробной клетки. Поэтому во многих публикациях подробно разобраны различные приемы и решения, связанные с подготовкой проб [22, 30, 45–47].

**Пробоподготовка.** Выработка стратегии индикации возбудителей инфекций на основе использования метода РС требует рассмотрения нескольких аспектов, касающихся подготовки проб, что имеет определяющее значение для получения оптимального результата.

Признано, что наилучшим методом пробоподготовки является культивирование возбудителя с выделением чистой культуры (рис. 3, а). Поскольку этот процесс занимает от нескольких часов до суток и нивелирует временные достоинства РС, при работе с природными или клиническими изолятами бактерий спектроскопический анализ проводится без предварительной пробоподготовки. Такая технология используется, как правило, с целью бактериального типирования штаммов при ретроспективном эпидемиологическом расследовании вспышек инфекции [22, 47, 48]. При этом метод РС не уступает по информативности импульсному гель-электрофорезу, который считается эталонным методом для типирования патогенных бактерий [22, 47].

Другой метод выделения и очистки образца — фильтрация через нанопористые мембраны (рис. 3, б). Он достаточно распространен при разделении твердых частиц из жидкой пробы [45, 46, 48]. Бактерии имеют разные размеры, обычно в пределах 0,5–5 мкм. Поскольку они значительно меньше эукариотических клеток, их фильтрация через нанопористые мембраны обеспечивает необходимое обогащение пробы.

Авторы работ [49, 50] объединили фильтрацию проб, включающих *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, в забуференном физиологическом растворе, используя нанопористые мембраны, содержащие металлические золотые или серебряные наночастицы, меченные соответствующими антителами для SERS-спектроскопии. При этом связанные с антителами бактерии оставались на мембране, а несвязанные — фильтровались. Предлагаемая методика позволила не только дифференцировать данные виды

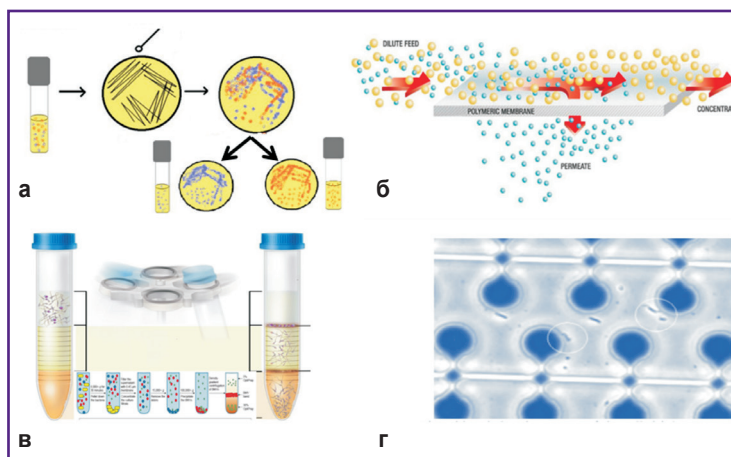


Рис. 3. Методы пробоподготовки для проведения рамановской спектроскопии (рисунок авторов):

а — культивирование; б — фильтрация; в — дифференциальное центрифугирование; г — диэлектрофорез

бактерий, но и отделить патогенный штамм *E. coli* (O157:H7) от непатогенного (K12). Общее время индикации составило менее 45 мин, а предел обнаружения бактерий находился в диапазоне от  $10^2$  до  $10^3$  КОЕ/мл буферного раствора [49].

В современных исследованиях перед фильтрацией проводят конъюгацию бактерий со специфическими антителами, мечеными металлическими наночастицами из золота или серебра. В типичном эксперименте конъюгированные бактерии после фильтрации остаются на поверхности фильтра, в то время как несвязанные наночастицы проходят через мембрану [19, 30, 50]. Эффективность этого способа достигалась сочетанием пробоподготовки с гигантским комбинационным рассеянием — одним из мощных методов усиления сигнала комбинационного рассеяния, его SERS- или TERS-разновидностями [14, 16].

В работе J. Chen с соавт. [50] в зависимости от типа фильтров весь процесс приготовления проб водной суспензии клеток *E. coli* занимал 10–20 мин. По сравнению с использованием SERS-подложек с наночастицами серебра (золота) без этапа фильтрации предел обнаружения бактерий был увеличен на два порядка — до  $10^5$  КОЕ/мл.

При выборе той или иной модификации РС следует учитывать химический состав исследуемых проб, содержание белка, концентрацию бактериальных клеток, а также наличие загрязнителей. Необходимо помнить, что пробоподготовка наряду с правильным анализом спектров комбинационного рассеяния имеет ключевое значение для успешной идентификации возбудителя [19, 22, 30, 45].

Другим методом детекции биомолекул и обогащения проб является дифференциальное центрифугирование (рис. 3, в). Как правило, его применяют при разделении бактериальных клеток в растворах с градиентом плотности, при котором учитываются масса и размер биомолекул [22].

Вторая разновидность центрифугирования зависит от Z-потенциала бактериальных клеток, связанных с нанокompозитными структурами на основе наночастиц золота (AuNP) и серебра (AgNP) и отличается сравнительной легкостью получения, стабильностью и хорошими плазмонными свойствами [9, 13, 51]. В исследованиях H. Zhou с соавт. [52] показано, что сигнал комбинационного рассеяния бактерий с помощью этой стратегии примерно в 30 раз выше, чем в случае использования только смешанной коллоидно-бактериальной суспензии. Общее время анализа не превышает 10 мин, а общий объем реагентов, необходимый для анализа бактерий, составляет всего 1 мл.

В методе центрифугирования проб на основе диэлектрофореза используют нелинейные электрокинетические явления для исследования поверхностных свойств бактерий, что позволяет концентрировать бактериальные клетки даже в сложных биосубстратах, таких как кровь или моча (рис. 3, г). Ряд исследовате-

лей показали, что грамотрицательные и грамположительные бактерии вследствие различий в строении и свойствах клеточной стенки иммобилизуются на разных электрических полюсах [53–56].

В зависимости от степени поляризуемости поверхности клеточной стенки бактерий, а также от состояния жидкой фазы и разведения исходного образца идентификация бактериальных агентов методом резонансной РС (SERS) происходит в течение 3–6 мин [57–59]. Чтобы применить этот метод для диагностики бактериемии, необходимо предварительно провести посев крови для получения более высокой концентрации бактерий (предел обнаружения — около  $10^5$  кл./мл) [59–61]. W.A. Braff с соавт. [55] успешно применили высокочувствительную трехмерную модификацию линейного диэлектрофореза для разделения бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus mitis* на уровне штаммов.

Еще один метод концентрации, сортировки бактериальных клеток и манипулирования ими связан с использованием так называемых оптических ловушек, или оптических пинцетов (Raman spectroscopy optical tweezers — RSOT). Этот метод — хорошо известная разновидность РС, позволяющая увеличивать интенсивность комбинационного рассеяния за счет увеличения времени накопления сигнала от одиночных молекул или клеток в растворе, при этом не осаждая и не фиксируя их [9, 45, 62]. Ранее метод был использован при селективной изоляции бактерий из смешанной культуры дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*) и двух бактериальных видов (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) на основании их специфических спектров комбинационного рассеяния с помощью сильно сфокусированного луча лазера [19, 44].

**Идентификация патогенов.** После завершения пробоподготовки бактерии становятся доступными для спектрометрического исследования. Посредством многомерного анализа данных для идентификации патогенов могут быть использованы даже незначительные фенотипические различия между спектрами бактериальных клеток. Программное обеспечение позволяет обрабатывать достаточно большие объемы данных, полученных при исследовании нескольких независимых серий. На результат идентификации могут повлиять физиологическое состояние микробных клеток или обработка параметров спектра [63–65].

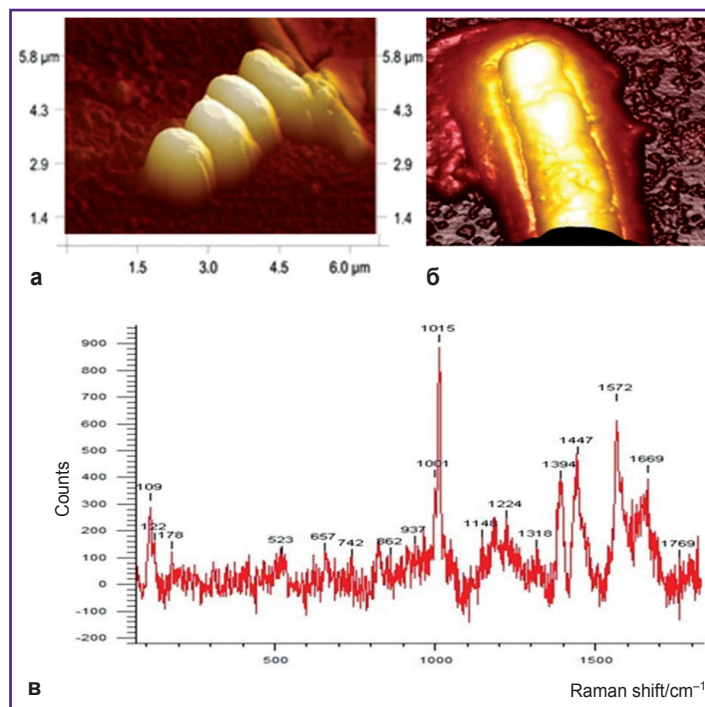
Надежность РС-идентификации основывается на качественной базе данных и статистических алгоритмах, которые применяются к спектрам комбинационного рассеяния. Разумеется, прилагаемая к прибору база данных содержит РС-спектры огромного количества родов, видов и штаммов микроорганизмов, выращенных в идеальных условиях культивирования (питательная среда, температура, время). Поэтому исследователю нужно создать условия культивирования, наиболее близкие к идеальным, что на практике можно реализовать только в определенной степени, поскольку состав пробы может быть сложным, особенно

при решении медицинских задач, и отличаться в каждом конкретном случае [66–68]. Фаза роста бактерии, условия хранения проб или загрязнение материала тяжелыми металлами — все это может оказать влияние на вариации спектров и на качество всего анализа [3, 64, 65, 69]. После получения достаточного количества спектров комбинационного рассеяния проводится классификация модели, анализ выполняется путем сравнения с базой данных спектров [3] (рис. 4).

Микробная контаминация внутренних сред организма является одной из основных причин возникновения инфекционных заболеваний. Точная и быстрая идентификация возбудителей в биосубстратах пациентов, а также оценка их антибиоточувствительности для врача-клинициста имеют важное значение [42, 43, 70]. Как правило, в научных исследованиях в пробе присутствует только один изучаемый вид бактерий. Однако в клинической практике при проведении анализа биопроб врач-бактериолог чаще сталкивается с бактериальной ассоциацией, и поэтому ставится задача идентифицировать все патогены.

Одними из первых D. Sam с соавт. [71] продемонстрировали успешный опыт спектроскопического анализа комбинационного рассеяния образцов с несколькими бактериальными видами посредством SERS-подложек. С помощью РС был идентифицирован состав смеси бактерий, состоящий из трех разных, но родственных бактериальных родов — *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris* и *Erwinia amylovora* — и трех штаммов *Escherichia coli* (BFK13, ВНК7, DH5α).

В последующих исследованиях было показано, что РС в сочетании с металлическими наночастицами (золотом или серебром) может быть использована при решении клинических задач для быстрой и специфической индикации *E. coli* (O157: H7), *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus spp.* и *Enterobacter spp.*



**Рис. 4. Пример использования рамановской спектроскопии при исследовании жизнеспособности *Bacillus subtilis* — сенной палочки, грамположительной бактерии:**

визуализация спор (а) и вегетативной формы (б) (атомно-силовая микроскопия). Рамановский спектр (в) одиночной споры выявил биохимический маркер зрелой эндоспоры — дипиколиновую кислоту, играющую важную роль в устойчивости бактерий и защите их ДНК от повреждений (рис. А.А. Карпенко)

[19, 22, 30, 45, 46]. Агрегация наночастиц и бактериальных клеток обеспечивала высокую интенсивность сигнала с SERS-подложек, облегчая предел обнаружения возбудителей до  $10^2$  КОЕ/мл. Для полного анализа требуется 30 мин [72–75]. В таблице приведен ряд примеров применения РС комбинационного рассеяния для решения клинических задач.

**Некоторые примеры применения рамановской спектроскопии для решения клинических задач**

Пробоподготовка	Биосубстраты	Патогены	Концентрация, КОЕ/мл	Время исследования	Источник
Фильтрация	Молоко, сыворотка крови	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> (MRSA)	$5 \cdot 10^2$	До 30 мин	Wang C. et al. [76]
Культивирование	Синовиальная жидкость	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	$10^2$ – $10^3$	60 мин	Fargasova A. et al. [77]
Культивирование	Сыворотка крови	<i>S. typhi</i>	$10^3$	2 ч	Naseer K. et al. [78]
Без пробоподготовки	Биопленка	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$10^3$ – $10^4$	1,5 ч	Bodelón G. et al. [79]
Центрифугирование	Мокрота, моча	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$10^3$	2 ч	Baron V.O. et al. [42]
Центрифугирование	Мокрота	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$10^3$ – $10^4$	60 мин	Cheong Y. et al. [43]
Без пробоподготовки	Отделяемое из уретры	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$10^1$ – $10^2$	1–1,5 ч	Chen Y. et al. [80]

В настоящее время очень быстро развиваются методы, использующие сочетание оптических волоконных биосенсоров с РС для сверхчувствительного обнаружения возбудителей инфекций [30, 81], так как спектры комбинационного рассеяния могут предоставлять большой массив информации о химической структуре интрабактериальных биомолекул [19, 22].

Поскольку чувствительность РС зависит от способа пробоподготовки, свойств биосубстратов и используемых наночастиц, в последние годы появляется много сообщений о разработке биосенсоров на основе РС, в том числе полевых и мобильных вариантов раман-спектрометров для быстрой и высокоэффективной индикации различных бактерий в условиях экспедиций, походов [22, 45, 46, 82]. Так, L. Chen с соавт. [46] был предложен мобильный биосенсор, работающий по принципу комбинационного рассеяния с усилением наночастицами Ag, для обнаружения живых бактерий в питьевой воде. С помощью этого биосенсора после предварительной обработки проб воды Triton X-100 (неионным детергентом) удалось в течение 5 мин провести индикацию *E. coli*, *P. aeruginosa*, устойчивых к метициллину штаммов *S. aureus* (MRSA) из клинических изолятов и *Listeria spp.* — из пищевых продуктов. Сравнение спектров позволило выявить и дифференцировать два вида *Listeria* (*L. monocytogenes* и *L. innocua*).

Другой группой исследователей, P. Wang с соавт. [83], был предложен портативный спектроскопический микрофлюидный биосенсор с высоким уровнем чувствительности (1–10 кл./мл) с субвидовой специфичностью для быстрой и эффективной индикации и характеристики *Escherichia coli* (O157:H7) в воде. При проведении индикации использовались моноклональные антитела с нанокристаллами золота.

Наряду с мечеными антителами в качестве зондов могут выступать антибиотики, специфически взаимодействующие с бактериальными клеточными стенками. Тайваньские исследователи T.Y. Liu с соавт. [84] в 2012 г. для выявления и идентификации в крови человека *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Mycobacterium smegmatis* воспользовались технологической платформой SERS с ванкомицином, к которому пришиты активные наночастицы серебра.

В исследованиях P.R. Sarge с соавт. [85, 86] показано, что с помощью РС можно выявить молекулярные конформационные изменения в бактериальной клетке после воздействия антибиотиков (хлорамфеникола и меропенема) или перекиси водорода. Авторами были получены данные о количественных и качественных внутриклеточных изменениях содержания пептидов и нуклеиновых кислот, а также выполнена оценка метаболизма по изменению концентрации цитрата у *Escherichia coli* в режиме реального времени *in vivo*.

Их японские коллеги провели мониторинг метаболизма *Staphylococcus epidermidis*, который является одним из ведущих нозокомиальных патогенов, связанных с перипротезными инфекциями биомедицин-

ских имплантатов, с помощью РС комбинационного рассеяния [30, 45]. Был исследован метаболический ответ бактерий на воздействие нитрида кремния *in situ*. Продемонстрирована динамика антимикробного воздействия и этапность бактериального лизиса, деградации мембраны и наступления клеточной смерти [30, 38].

Интересные результаты о возможности использования резонансной РС в сочетании с конфокальной микроскопией при изучении изменений химической структуры бактериальных биопленок в процессе их образования представлены китайскими и южнокорейскими исследователями в последние годы [22, 46]. Одновременно были верифицированы все виды бактериальных клеток, входящие в сообщества, их метаболизм и сигнальные белковые молекулы, участвующие в конкурентном межвидовом взаимодействии.

Таким образом, высокие аналитические характеристики РС и усиленных модификаций метода (скорость детекции, чувствительность) делают эту бесконтактную технологию очень ценным и перспективным диагностическим инструментом для биомедицинских исследований. Высокая специфичность РС позволяет получать ценную информацию о фенотипе микробной клетки, что в сочетании с хемометрическими данными дает возможность идентифицировать бактерии до вида и штамма, а также определять уровень метаболизма и степень жизнеспособности. Как уже указывалось, надежность индикации в значительной степени зависит от качества и полноты базы данных. Еще одно преимущество в отношении обнаружения бактерий методом РС — неинвазивный характер технологии. Клетки остаются неразрушенными и доступными для дальнейшего анализа.

### РС-совместимые методы для индикации вирусов

С помощью комбинационной спектроскопии японские ученые H. Mori с соавт. [87] провели исследование протеиновых и аминокислотных структур норовирусоподобных частиц до и после инкапсулирования в кубические микрокристаллы. Анализ спектроскопических данных позволил выявить конформационно-чувствительные полосы комбинационного рассеяния. Полученные данные дают возможность проводить эксперименты по изучению влияния на вирусы при доставке лекарственных препаратов *in situ*.

Пакистанские ученые S. Khan с соавт. [88] изучали возможность диагностики вирусного гепатита В посредством РС в сочетании с методом распознавания образов. Для исследования были использованы 119 подтвержденных образцов сывороток пациентов одной из больниц страны, зараженных вирусным гепатитом В. Была получена диагностическая точность метода около 98% с чувствительностью 100% и специфичностью 95%.

A. Sohail с соавт. [89] было предпринято аналогич-



ное исследование, в котором представлена диагностическая система с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния для выявления вирусного гепатита С. Система показала значительную диагностическую мощность с точки зрения точности, чувствительности и специфичности в виде 95, 97 и 94% соответственно. Верификация вирусного гепатита С у инфицированных пациентов была проведена на основе молекулярных спектров рамановского рассеяния сыворотки крови.

Метод РС настолько успешно зарекомендовал себя в качестве инструмента для идентификации возбудителей вирусных инфекций, что его предлагается использовать как альтернативу традиционным методам верификации, например твердофазному иммуноферментному анализу. Пакистанские исследователи Т. Mahmood с соавт. [29] успешно апробировали РС комбинационного рассеяния для индикации вируса Денге в качестве метода быстрого скрининга сывороток крови больных пациентов. В результате сравнительных исследований спектральный метод в сочетании с факторным дискриминантным анализом показал более высокие аналитические характеристики (чувствительность — 97,95% и специфичность — 95,40%), чем традиционный иммуноферментный анализ.

Таким образом, применение различных модификаций методов РС в биомедицинских исследованиях и микробиологии за последнее десятилетие зарекомендовало себя как успешная биотехнология для быстрой и надежной идентификации бактерий и вирусов. Время, необходимое для обнаружения возбудителя, служит важным фактором, и оно, по данным разных исследователей, с учетом пробоподготовки не превышает 2 ч, что делает метод комбинационного рассеяния перспективным диагностическим методом [86, 88, 90, 91].

Отличаясь высокой специфичностью и чувствительностью, РС способна дать интересную информацию для оценки фенотипической пластичности бактериальной клетки, оценить метаболическую активность, идентифицировать инфекционные агенты до вида в смешанной культуре. Однако нужно учитывать, что надежность идентификации возбудителя сильно зависит от качества базы данных спектров рассеяния [86, 87, 92].

Перспективы дальнейшего использования метода РС в биомедицине связаны, с одной стороны, с развитием автоматизации проведения анализа и стандартизации операционной процедуры, а с другой — с созданием на основе этой диагностической технологии мобильных и миниатюрных устройств, позволяющих проводить исследования у постели больного (в режиме *point of care*) или в полевых условиях [47, 86, 93].

Еще одной немаловажной проблемой является создание обширной базы данных с учетом не только вариативных изменений специфических спектров рассеяния различных видов и штаммов возбудителей

инфекций, но и возможных фенотипических вариантов морфологической и метаболической пластичности бактерий.

Решение вышеупомянутых проблем позволит использовать метод РС не только в качестве технологии для фундаментальных исследований, но и в практической медицине для обнаружения бактерий и вирусов — возбудителей инфекций. Из всего сказанного можно сделать вывод, что РС обладает огромным потенциалом, особенно в сочетании с эффективными стратегиями изоляции микроорганизмов и модификациями метода, позволяющими усилить сигнал комбинационного рассеяния и исследовать субклеточные структуры биологических клеток.

В связи с этим нельзя не упомянуть еще одно интересное направление биомедицинского применения РС, с помощью которого российские исследователи из МГУ совместно с коллегами из Дании и Германии получили уникальную информацию об окислительно-восстановительном потенциале и конформациях цитохрома С митохондрий, что связано с эффективностью обеспечения клеток энергией и развитием апоптоза [19, 30, 94]. Это позволило выйти на новый уровень в изучении данных внутриклеточных органелл. Выявлено, что спектры SERS живых митохондрий, размещенные на иерархически структурированных подложках с наночастицами серебра, предоставляют эксклюзивную информацию об изменениях в структуре молекул цитохрома С при изменении мембранного потенциала митохондрий, градиента протонов и активности АТФ-синтетазы [94].

## Заключение

За последние 5–10 лет рамановская спектроскопия привлекает все большее внимание специалистов биомедицинского профиля. В настоящем обзоре показано успешное применение РС для детекции бактерий и вирусов. Среди процитированных работ есть многочисленные подтверждения того факта, что экспериментальные и научные микробиологические исследования с использованием спектроскопических инструментов быстро вошли в диагностический арсенал методов клинической медицины.

Помимо высокочувствительной и быстрой индикации инфекционных агентов современные модификации РС — методы гигантского комбинационного рассеяния — позволяют решать многочисленные задачи молекулярной микробиологии, направленные на исследование метаболизма прокариот, их фенотипической морфологической и метаболической гетерогенности, на оценку жизнеспособности и дифференцировку форм запрограммированной клеточной гибели бактериальных клеток.

В последние годы развитие биомедицинских методов РС двигалось в направлении расширения как приборной базы, так и прикладных медицинских исследований. Появление портативных раман-спектрометров

лабораторного уровня и высокого разрешения, нацеленных на высокоэффективные биомедицинские исследования, в комплекте с конфокальным рамановским микроскопом и программным обеспечением позволяет проводить анализ полученных данных, выбор образцов, предварительную обработку и исследование спектров в режиме реального времени.

Разработка миниатюрных биосенсоров, способных исследовать и измерять различные явления в наномасштабе, привела к трансформации методов диагностики и лечения заболеваний [95, 96]. В частности, биофункциональные рамановские наночастицы *in vitro* и *in vivo* были использованы для нанобиосенсориализации и мультиплексной диагностики с целью обнаружения различных инфекционных агентов.

Создание портативных вариантов миниатюрных раман-спектрометров, профессиональных карманных анализаторов рамановского рассеяния позволило проводить высокочувствительные микробиологические исследования в полевых условиях [97], в море [98], антарктических экспедициях [99], космических полетах [100, 101].

Рамановская спектроскопия оказалась идеальным инструментом для медицинских исследований *in vitro* и *in vivo* при выявлении молекулярных маркеров рака [72, 100, 102], атеросклеротического поражения сосудов [100, 103], наркотического отравления [104], для оценки биодegradации наночастиц в организме и тераностики многих онкологических заболеваний [105, 106]. В настоящее время РС активно применяется в фармакологии (исследование молекулярной активности лекарственных препаратов и тестирование их биологической активности) [11, 96, 100, 107].

Наконец, уникальные аналитические возможности рамановской спектроскопии открывают новые подходы для решения вопросов химической и биологической безопасности. Китайские ученые предложили использовать поверхностно-усиленную технологию SERS с алюминиевыми подложками, покрытыми золотом, для захвата молекул фосфорорганических отравляющих веществ. В результате такая технология позволяет обнаруживать эти вещества в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  [108]. Компания FLIR Systems (США) в числе других приборов включила портативный раман-спектрометр FirstDefender RMX (Thermo Scientific, США) в состав разработанного в 2016 г. комплекта CBRN DR-SKO IDIQ, предназначенного для проведения всех видов радиационной, химической и биологической разведки, который уже поступает на снабжение Вооруженных сил США [109].

Огромный потенциал рамановской спектроскопии очевиден, но для максимально полной его реализации метод нуждается в дополнительном развитии. Среди наиболее перспективных направлений — дальнейшая автоматизация, повышение надежности, портативности и мобильности раман-спектрометров. За последние годы прослеживается определенный тренд в этом направлении: ряд портативных моделей для биомеди-

цинских исследований в настоящее время разрабатываются или доступны на рынке (Bio Particle Explorer, rapid, Германия; i-Raman Plus, Италия; SpectraCell RA, river diagnostics, Нидерланды).

Следующим направлением является разработка и внедрение стандартной операционной процедуры, которая оптимизирует воспроизведение всей цепочки этапов — от отбора проб, пробоподготовки и до измерения параметров спектров комбинационного рассеяния и хемометрической идентификации бактерий.

И, наконец, еще одним важным моментом является совершенствование и полнота баз данных спектров рамановского рассеяния, которые должны учитывать фенотипические вариации физиологических состояний бактерий.

Реализация указанных перспективных направлений поможет дальнейшему распространению этой современной диагностической технологии в биологических научных исследованиях и практической медицине.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект №18-5-099.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 2012; 112(5): 841–852, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>.
2. Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic resistance threats in the United State, 2013*. URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
3. Pahlow S., Meisel S., Cialla-May D., Weber K., Rösch P., Popp J. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 89: 105–120, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.006>.
4. Morens D.M., Fauci A.S. Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. *PLoS Pathog* 2013; 9(7): e1003467, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003467>.
5. Suda Y., Chamberlain J., Dowall S.D., Saijo M., Horimoto T., Hewson R., Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that utilizes a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralizing activity against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis* 2018; 71(3): 205–208, <https://doi.org/10.7883/yoken.jjid.2017.354>.
6. Huang W.E., Griffiths R.I., Thompson I.P., Bailey M.J., Whiteley A.S. Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Anal Chem* 2004; 76(15): 4452–4458, <https://doi.org/10.1021/ac049753k>.
7. Huang W.E., Li M., Jarvis R.M., Goodacre R., Banwart S.A. Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy. *Adv Appl Microbiol* 2010; 70: 153–186, [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(10\)70005-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(10)70005-8).
8. Patel I.S., Premasiri W.R., Moir D.T., Ziegler L.D. Barcoding bacterial cells: a SERS based methodology for pathogen identification. *J Raman Spectrosc* 2008; 39: 1660–1672, <https://doi.org/10.1002/jrs.2064>.

9. Zhu X., Xu T., Lin Q., Duan Y. Technical development of Raman spectroscopy: from instrumental to advanced combined technologies. *Appl Spectrosc Rev* 2014; 49(1): 64–82, <https://doi.org/10.1080/05704928.2013.798801>.
10. Popp J., Krafft C., Mayerhöfer T. Modern Raman spectroscopy for biomedical applications. A variety of Raman spectroscopical techniques on the threshold of biomedical applications. *Opt Photon* 2011; 6(4): 24–28, <https://doi.org/10.1002/opph.201190383>.
11. Li Y.-S., Church J.S. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *J Food Drug Anal* 2014; 22(1): 29–48, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.003>.
12. Mann T.Z., Haddad L.B., Williams T.R., Read J.S., Dee D.L., Dziuban E.J., Pérez-Padilla J., Jamieson D.J., Honein M.A., Shapiro-Mendoza C.K. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2018, 32(4): 358–368, <https://doi.org/10.1111/ppe.12478>.
13. Notingher I. Raman spectroscopy cell-based biosensors. *Sensors* 2007; 7(8): 1343–1358, <https://doi.org/10.3390/s7081343>.
14. Efrima S., Zeiri L. Understanding SERS of bacteria. *J Raman Spectrosc* 2009; 40(3): 277–288, <https://doi.org/10.1002/jrs.2121>.
15. Dina N.E., Zhou H., Colniță A., Leopold N., Szoke-Nagy T., Coman C., Haisch C. Rapid single-cell detection and identification of pathogens by using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* 2017; 142(10): 1782–1789, <https://doi.org/10.1039/c7an00106a>.
16. Premasiri W.R., Moir D.T., Klempner M.S., Krieger N., Jones G., Ziegler L.D. Characterization of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria. *J Phys Chem B* 2005; 109(1): 312–320, <https://doi.org/10.1021/jp040442n>.
17. Law J., Ab Mutalib N., Chan K., Lee L. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol* 2015; 5: 770, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>.
18. Mosier-Boss P.A. Review on SERS of bacteria. *Biosensors* 2017; 7(4): 51, <https://doi.org/10.3390/bios7040051>.
19. Pacheco M.T.T., Moreira L.M. Raman spectroscopy: new perspectives for its clinical application in diagnosis. *Photomed Laser Surg* 2013; 31(10): 463–465, <https://doi.org/10.1089/pho.2013.9873>.
20. Wang L., Ye C., Xu H., Aguilar Z.P., Xiong Y., Lai W., Wei H. Development of an SD-PMA-mPCR assay with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Staphylococcus aureus* in food products. *Food Control* 2015; 57: 314–320.
21. Sas M.A., Comtet L., Donnet F., Mertens M., Vatansever Z., Tordo N., Pourquier P., Groschup M.H. A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. *Antiviral Res* 2018; 151: 24–26, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.006>.
22. Neng J., Li Y., Driscoll A.J., Wilson W.C., Johnson P.A. Detection of multiple pathogens in serum using silica-encapsulated nanotags in a surface-enhanced Raman scattering-based immunoassay. *J Agric Food Chem* 2018; 66(22): 5707–5712, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00026>.
23. Schmitt M., Popp J. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *J Raman Spectrosc* 2006; 37(1–3): 20–28, <https://doi.org/10.1002/jrs.1486>.
24. Bocklitz T.W., Crecelius A.C., Matthäus C., Tarcea N., von Eggeling F., Schmitt M., Schubert U.S., Popp J. Deeper understanding of biological tissue: quantitative correlation of MALDI-TOF and Raman imaging. *Anal Chem* 2013; 85(22): 10829–10834, <https://doi.org/10.1021/ac402175c>.
25. Bocklitz T.W., Bräutigam K., Urbanek A., Hoffmann F., von Eggeling F., Ernst G., Schmitt M., Schubert U., Guntinas-Lichius O., Popp J. Novel workflow for combining Raman spectroscopy and MALDI-MSI for tissue based studies. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(26): 7865–7873, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8987-5>.
26. Sauguet M., Valot B., Bertrand X., Hocquet D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol* 2017; 25(6): 447–455, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.
27. Cho I.H., Ku S. Current technical approaches for the early detection of foodborne pathogens: challenges and opportunities. *Int J Mol Sci* 2017; 18: E2078, <https://doi.org/10.3390/ijms18102078>.
28. Cowan M.K., Bunn J. *Microbiology fundamentals: a clinical approach*. McGraw-Hill Education; New York, NY, USA; 2016.
29. Mahmood T., Nawaz H., Ditta A., Majeed M.I., Hanif M.A., Rashid N., Bhatti H.N., Nargis H.F., Saleem M., Bonnier F., Byrne H.J. Raman spectral analysis for rapid screening of dengue infection. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018; 200: 136–142, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.04.018>.
30. Mao Z., Liu Z., Yang J., Han X., Zhao B., Zhao C. In situ semi-quantitative assessment of single-cell viability by resonance Raman spectroscopy. *Chem Commun (Camb)* 2018; 54(52): 7135–7138, <https://doi.org/10.1039/c8cc01336e>.
31. Bergkessel M., Basta D.W., Newman D.K. The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14(9): 549–562, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.107>.
32. Tao Y., Wang Y., Huang S., Zhu P., Huang W.E., Ling J., Xu J. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D<sub>2</sub>O-labeled single-cell Raman microspectroscopy. *Anal Chem* 2017; 89(7): 4108–4115, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05051>.
33. Li M.Q., Xu J., Romero-Gonzalez M., Banwart S.A., Huang W.E. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23(1): 56–63, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.019>.
34. Zhao X., Li M., Xu Z. Detection of foodborne pathogens by surface enhanced Raman spectroscopy. *Front Microbiol* 2018; 9: 1236, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01236>.
35. Premasiri W.R., Chen Y., Williamson P.M., Bandarage D.C., Pyles C., Ziegler L.D. Rapid urinary tract infection diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): identification and antibiotic susceptibilities. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(11): 3043–3054, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0244-7>.
36. Sundaram J., Park B., Kwon Y., Lawrence K.C. Surface enhanced Raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2013; 1(167): 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.013>.
37. Cialla-May D., Zheng X.S., Weber K., Popp J. Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics.

*Chem Soc Rev* 2017; 46: 3945–3961, <https://doi.org/10.1039/c7cs00172j>.

38. Kahraman M., Mullen E.R., Korkmaz A., Wachsmann-Hogiu S. Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. *Nanophotonics* 2017; 6(5): 831–852, <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0174>.

39. Laing S., Jamieson L.E., Faulds K., Graham D. Surface-enhanced Raman spectroscopy for in vivo biosensing. *Nat Rev Chem* 2017; 1(8): 0060, <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0060>.

40. Hu J., Wang L., Li F., Han Y.L., Lin M., Lu T.J., Xu F. Oligonucleotide-linked gold nanoparticle aggregates for enhanced sensitivity in lateral flow assays. *Lab Chip* 2013; 13(22): 4352–4357.

41. Banerjee R., Jaiswal A. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst* 2018; 143(9): 1970–1996, <https://doi.org/10.1039/c8an00307f>.

42. Baron V.O., Chen M., Clark S.O., Williams A., Dholakia K., Gillespie S.H. Detecting phenotypically resistant mycobacterium tuberculosis using wavelength modulated Raman spectroscopy. *Methods Mol Biol* 2018; 1736: 41–50, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7638-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7638-6_4).

43. Cheong Y., Kim Y.J., Kang H., Choi S., Lee H.J. Rapid label-free identification of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistant strains by the drop-coating deposition surface-enhanced Raman scattering method. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2017; 183: 53–59, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.044>.

44. Kallaway C., Almond L.M., Barr H., Wood J., Hutchings J., Kendall C., Stone N. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10(3): 207–219, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.01.008>.

45. Boschetto F., Adachi T., Horiguchi S., Fainozzi D., Parmigiani F., Marin E., Zhu W., McEntire B., Yamamoto T., Kanamura N., Mazda O., Ohgihara E., Pezzotti G. Monitoring metabolic reactions in *Staphylococcus epidermidis* exposed to silicon nitride using in situ time-lapse Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2018; 23(5): 1–10, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.5.056002>.

46. Chen L., Mungroo N., Daikuara L., Neethirajan S. Label-free NIR-SERS discrimination and detection of foodborne bacteria by in situ synthesis of Ag colloids. *J Nanobiotechnology* 2015; 13(1): 45, <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0106-4>.

47. Mungroo N.A., Oliveira G., Neethirajan S. SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens. *Mikrochim Acta* 2016; 183(2): 697–707, <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1698-y>.

48. Willemse-Erix D., Bakker-Schut T., Slagboom-Bax F., Jachtenberg J., Lemmensden N.B., Toom B., Papagiannitsis C.C., Kuntaman K., Puppels G., van Belkum A., Severin J.A., Goessens W., Maquelin K. Rapid typing of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by use of SpectraCell RA. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1370–1375, <https://doi.org/10.1128/jcm.05423-11>.

49. Ravindranath S.P., Wang Y., Irudayaraj J. SERS driven cross-platform based multiplex pathogen detection. *Sens Actuators B Chem* 2011; 152(2): 183–190, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.12.005>.

50. Chen J., Wu X., Huang Y.-W., Zhao Y. Detection of *E. coli* using SERS active filters with silver nanorod array. *Sensors Actuators B Chem* 2014; 191: 485–490, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.038>.

51. Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., Karmakar S., Sen T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* 2015; 4(1): 672, <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>.

52. Zhou H., Yang D., Mleva N.P., Mircescu N.E., Niessner R., Haisch C. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles. *Anal Chem* 2014; 86(3): 1525–1533, <https://doi.org/10.1021/ac402935p>.

53. Beck J.D., Shang L., Li B., Marcus M.S., Hamers R.J. Discrimination between *Bacillus* species by impedance analysis of individual dielectrophoretically positioned spores. *Anal Chem* 2008; 80(10): 3757–3761, <https://doi.org/10.1021/ac702113t>.

54. Braff W.A., Pignier A., Buie C.R. High sensitivity three-dimensional insulator-based dielectrophoresis. *Lab Chip* 2012; 12(7): 1327–1331, <https://doi.org/10.1039/c2lc21212a>.

55. Braff W.A., Willner D., Hugenholtz P., Rabaey K., Buie C.R. Dielectrophoresis-based discrimination of bacteria at the strain level based on their surface properties. *PLoS One* 2013; 8(10): e76751, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076751>.

56. Zellner P., Agah M. Silicon insulator-based dielectrophoresis devices for minimized heating effects. *Electrophoresis* 2012; 33(16): 2498–2507, <https://doi.org/10.1002/elps.201100661>.

57. Barik A., Cherukulappurath S., Wittenberg N.J., Johnson T.W., Oh S.H. Dielectrophoresis-assisted Raman spectroscopy of intravesicular analytes on metallic pyramids. *Anal Chem* 2016; 88(3): 1704–1710, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03719>.

58. Schröder U.C., Ramoji A., Glaser U., Sachse S., Leiterer C., Csaki A., Hübner U., Fritzsche W., Pfister W., Bauer M., Popp J., Neugebauer U. Combined dielectrophoresis-Raman setup for the classification of pathogens recovered from the urinary tract. *Anal Chem* 2013; 85(22): 10717–10724, <https://doi.org/10.1021/ac4021616>.

59. Schröder U.C., Bokeloh F., O'Sullivan M., Glaser U., Wolf K., Pfister W., Popp J., Ducreé J., Neugebauer U. Rapid, culture-independent, optical diagnostics of centrifugally captured bacteria from urine samples. *Biomicrofluidics* 2015; 9(4): 044118, <https://doi.org/10.1063/1.4928070>.

60. Boardman A.K., Wong W.S., Premasiri W.R., Ziegler L.D., Lee J.C. Rapid detection of bacteria from blood with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2016; 88(16): 8026–8035, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01273>.

61. Sinha S.S., Jones S., Pramanik A., Ray P.C. Nanoarchitecture based SERS for biomolecular fingerprinting and label-free disease markers diagnosis. *Acc Chem Res* 2016; 49(12): 2725–2735, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00384>.

62. Baritoux J.C., Simon A.C., Schultz E., Emain C., Laurent P. A study on identification of bacteria in environmental samples using single-cell Raman spectroscopy: feasibility and reference libraries. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23(9): 8184–8191, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5953-x>.

63. Escoriza M.F., Vanbriesen J.M., Stewart S.,

- Maier J. Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2006; 60(9): 971–976, <https://doi.org/10.1366/000370206778397290>.
64. Walter A., Schumacher W., Bocklitz T., Reinicke M., Rösch P., Kothe E., Popp J. From bulk to single-cell classification of the filamentous growing *Streptomyces* bacteria by means of Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2011; 65(10): 1116–1125, <https://doi.org/10.1366/11-06329>.
65. Walter A., Kuhri S., Reinicke M., Bocklitz T., Schumacher W., Rösch P., Merten D., Büchel G., Kothe E., Popp J. Raman spectroscopic detection of Nickel impact on single *Streptomyces* cells — possible bioindicators for heavy metal contamination. *J Raman Spectrosc* 2012; 43: 1058–1064, <https://doi.org/10.1002/jrs.3126>.
66. Almarashi J.F.M., Kapel N., Wilkinson T.S., Telle H.H. Raman spectroscopy of bacterial species and strains cultivated under reproducible conditions. *Spectroscopy* 2012; 27: 361–365, <https://doi.org/10.1155/2012/540490>.
67. Qiu W., Xu H., Takalkar S., Gurung A.S., Liu B., Zheng Y., Guo Z., Baloda M., Baryeh K., Liu G. Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence. *Biosens Bioelectron* 2015; 64: 367–372, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.028>.
68. Xu J., Webb I., Poole P., Huang W.E. Label-free discrimination of Rhizobial bacteroids and mutants by single-cell Raman microspectroscopy. *Anal Chem* 2017; 89(12): 6336–6340, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01160>.
69. Assaf A., Cordella C.B., Thouand G. Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579:2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(20): 4899–4910, <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7909-2>.
70. Gilbert N. Four stories of antibacterial breakthroughs. *Nature* 2018; 555(7695): S5–S7, <https://doi.org/10.1038/d41586-018-02475-3>.
71. Cam D., Keseroglu K., Kahraman M., Sahin F., Culha M. Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering. *J Raman Spectrosc* 2010; 41(5): 484–489, <https://doi.org/10.1002/jrs.2475>.
72. De Pablo J.G., Armistead F.J., Peyman S.A., Bonthron D., Lones M., Smith S., Evans S.D. Biochemical fingerprint of colorectal cancer cell lines using label-free live single-cell Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2018; 49(8): 1323–1332, <https://doi.org/10.1002/jrs.5389>.
73. Wang Y., Ravindranath S., Irudayaraj J. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399(3): 1271–1278, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4453-6>.
74. Wang Y., Song Y., Tao Y., Muhamadali H., Goodacre R., Zhou N.Y., Preston G.M., Xu J., Huang W.E. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. *Anal Chem* 2016; 88(19): 9443–9450, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01602>.
75. Fan Z., Senapati D., Khan S.A., Singh A.K., Hamme A., Yust B., Sardar D., Ray P.C. Popcorn-shaped magnetic core-plasmonic shell multifunctional nanoparticles for the targeted magnetic separation and enrichment, label-free SERS imaging, and photothermal destruction of multidrug-resistant bacteria. *Chemistry* 2013; 19(8): 2839–2847, <https://doi.org/10.1002/chem.201202948>.
76. Wang C., Madiyar F., Yu C., Li J. Detection of extremely low concentration waterborne pathogen using a multiplexing self-referencing SERS microfluidic biosensor. *J Biol Eng* 2017; 11: 9, <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0051-x>.
77. Fargasova A., Balzerova A., Pucek R., Sedláková M.H., Bogdanova K., Gallo J., Kolar M., Ranc V., Zboril R. Detection of prosthetic joint infection based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). *Anal Chem* 2017; 89(12): 6598–6607, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00759>.
78. Naseer K., Amin A., Saleem M., Qazi J. Raman spectroscopy based differentiation of typhoid and dengue fever in infected human sera. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018; 206: 197–201, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.008>.
79. Bodelón G., Montes-García V., Pérez-Juste J., Pastoriza-Santos I. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy for label-free analysis of *P. aeruginosa* quorum sensing. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 143, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00143>.
80. Chen Y., Premasiri W.R., Ziegler L.D. Surface enhanced Raman spectroscopy of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* for diagnostics, and extra-cellular metabolomics and biochemical monitoring. *Sci Rep* 2018; 8(1): 5163, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23562-5>.
81. Ciobotă V., Burkhardt E.-M., Schumacher W., Rösch P., Kusel K., Popp J. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397: 2929–2937, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3895-1>.
82. Gao X., Xu H., Baloda M., Gurung A.S., Xu L.-P., Wang T., Zhang X., Liu G. Visual detection of microRNA with lateral flow nucleic acid biosensor. *Biosens Bioelectron* 2014; 54: 578–584, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.055>.
83. Wang P., Pang S., Chen J., McLandsborough L., Nugen S.R., Fan M., He L. Label-free mapping of single bacterial cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* 2016; 141(4): 1356–1362, <https://doi.org/10.1039/c5an02175h>.
84. Liu T.Y., Chen Y., Wang H.H., Huang Y.L., Chao Y.C., Tsai K.T., Cheng W.C., Chuang C.Y., Tsai Y.H., Huang C.Y., Wang D.W., Lin C.H., Wang J.K., Wang Y.L. Differentiation of bacteria cell wall using Raman scattering enhanced by nanoparticle array. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 12: 5004–5008, <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.4941>.
85. Carey P.R., Heidari-Torkabadi H. New techniques in antibiotic discovery and resistance: Raman spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1354(1): 67–81, <https://doi.org/10.1111/nyas.12847>.
86. Carey P.R., Whitmer G.R., Yoon M.J., Lombardo M.N., Pusztai-Carey M., Heidari-Torkabadi H., Che T. Measuring drug-induced changes in metabolite populations of live bacteria: real time analysis by Raman spectroscopy. *J Phys Chem B* 2018; 122(24): 6377–6385, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b03279>.
87. Mori H., Oda N., Abe S., Ueno T., Zhu W., Pernstich C., Pezzotti G. Raman spectroscopy insight into Norovirus encapsulation in *Bombyx mori* cytopovirus cubic microcrystals. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018; 203: 19–30, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.066>.
88. Khan S., Ullah R., Khan A., Ashraf R., Ali H., Bilal M., Saleem M. Analysis of hepatitis B virus infection in blood sera using Raman spectroscopy and machine learning. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 23: 89–93, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.010>.

89. Sohail A., Khan S., Ullah R., Qureshi S.A., Bilal M., Khan A. Analysis of hepatitis C infection using Raman spectroscopy and proximity based classification in the transformed domain. *Biomed Opt Express* 2018; 9(5): 2041–2055, <https://doi.org/10.1364/boe.9.002041>.
90. Thomm A.M., Schotthoefler A.M., Dupuis A.P., Kramer L.D., Frost H.M., Fritsche T.R., Harrington Y.A., Knox K.K., Kehl S.C. Development and validation of a serologic test panel for detection of Powassan virus infection in U.S. patients residing in regions where lyme disease is endemic. *mSphere* 2018; 3(1): e00467-17, <https://doi.org/10.1128/msphere.00467-17>.
91. Hoch T., Breton E., Vatansever Z. Dynamic modeling of Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) spread to test control strategies. *J Med Entomol* 2018; 55(5): 1124–1132, <https://doi.org/10.1093/jme/tjy035>.
92. Channon R.B., Yang Y., Feibelman K.M., Geiss B.J., Dandy D.S., Henry C.S. Development of an electrochemical paper-based analytical device for trace detection of virus particles. *Anal Chem* 2018; 90(12): 7777–7783, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02042>.
93. Schulze H.G., Rangan S., Piret J.M., Blades M.W., Turner R.F.B. Developing fully automated quality control methods for preprocessing Raman spectra of biomedical and biological samples. *Appl Spectrosc* 2018; 72(9): 1322–1340, <https://doi.org/10.1177/0003702818778031>.
94. Brazhe N.A., Evlyukhin A.B., Goodilin E.A., Semenova A.A., Novikov S.M., Bozhevolyi S.I., Chichkov B.N., Sarycheva A.S., Baizhumanov A.A., Nikelshparg E.I., Deev L.I., Maksimov E.G., Maksimov G.V., Sosnovtseva O. Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2015; 5: 13793, <https://doi.org/10.1038/srep13793>.
95. Guo H., Jorner J.M., Gan Q., Sun Z. Cooperative Raman spectroscopy for real-time in vivo nano-biosensing. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2017; 16(7): 571–584, <https://doi.org/10.1109/tnb.2017.2749183>.
96. Guo S., Kohler A., Zimmermann B., Heinke R., Stöckel S., Rösch P., Popp J., Bocklitz T. Extended multiplicative signal correction based model transfer for Raman spectroscopy in biological applications. *Anal Chem* 2018; 90(16): 9787–9795, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01536>.
97. Lu X., Al-Qadiri H., Lin M., Rasco B. Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria. *Food Bioproc Tech* 2011; 4(6): 919–935, <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0516-8>.
98. Song Y., Kaster A.K., Vollmers J., Song Y., Davison P.A., Frentrup M., Preston G.M., Thompson I.P., Murrell J.C., Yin H., Hunter C.N., Huang W.E. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea. *Microb Biotechnol* 2017; 10(1): 125–137, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12420>.
99. Sansano A., Lopez-Reyes G., Medina J., Rull F. Analysis of arctic carbonates profiles by Raman spectroscopy using exomars Raman laser spectrometer. *EPSC Abstracts* 2011. URL: <https://meetingorganizer.copernicus.org/EPSC-DPS2011/EPSC-DPS2011-856-1.pdf>.
100. Eberhardt K., Stiebing C., Matthäus C., Schmitt M., Popp J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(6): 773–787, <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1036744>.
101. Jehlička J., Culka A., Nedbalová L. Colonization of snow by microorganisms as revealed using miniature Raman spectrometers-possibilities for detecting carotenoids of psychrophiles on mars? *Astrobiology* 2016; 16(12): 913–924, <https://doi.org/10.1089/ast.2016.1487>.
102. Jenkins C.A., Lewis P.D., Dunstan P.R., Harris D.A. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8(5): 427–438, <https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i5.427>.
103. Kochan K., Marzec K.M., Chruszcz-Lipska K., Jaształ A., Maslak E., Musiolik H., Chłopicki S., Baranska M. Pathological changes in the biochemical profile of the liver in atherosclerosis and diabetes assessed by Raman spectroscopy. *Analyst* 2013; 138(14): 3885–3890, <https://doi.org/10.1039/c3an00216k>.
104. Neugebauer U., Rösch P., Popp J. Raman spectroscopy towards clinical application: drug monitoring and pathogen identification. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: S35–S39, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.10.014>.
105. Tolstik E., Osminkina L.A., Matthäus C., Burkhardt M., Tsurikov K.E., Natashina U.A., Timoshenko V.Y., Heintzmann R., Popp J., Sivakov V. Studies of silicon nanoparticles uptake and biodegradation in cancer cells by Raman spectroscopy. *Nanomedicine* 2016; 12(7): 1931–1940, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.04.004>.
106. Mehta H.H., Prater A.G., Shamoo Y. Using experimental evolution to identify druggable targets that could inhibit the evolution of antimicrobial resistance. *J Antibiot (Tokyo)* 2018; 71(2): 279–286, <https://doi.org/10.1038/ja.2017.108>.
107. Gala U., Chauhan H. Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10(2): 187–206, <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.981522>.
108. Zhao Q., Liu G., Zhang H., Zhou F., Li Y., Cai W. SERS-based ultrasensitive detection of organophosphorus nerve agents via substrate's surface modification. *J Hazard Mater* 2017; 324(Pt B): 194–202, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.049>.
109. *American security today: Informational Internet-portal*. URL: <https://americansecuritytoday.com/flir-receives-54-2m-order-us-dod-dr-sko-systems/>.