

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.04.025

拉曼光谱用于细菌快速药敏检测的研究进展^{*}

杨文旭,张心宇,刘旭综述,刘禹[△]审校

哈尔滨医科大学附属第四医院检验科,黑龙江哈尔滨 150000

摘 要:致病菌对人类健康构成重大威胁,抗菌药物的滥用导致了细菌耐药性的发展和传播。目前,临床微生物室常用的药敏试验,如纸片扩散法、浓度梯度纸条扩散法、肉汤稀释法和全自动药敏分析等都是基于细菌生长的方法,且操作流程繁琐,需要 8~16 h 才能出结果。该文从快速药敏检测(RAST)的研究出发,重点叙述了拉曼光谱在 RAST 领域的研究进展。利用拉曼光谱对细菌进行基于代谢表型的药敏检测,检测时间明显缩短,优于常规基于细菌生长的药敏方法。但该方法缺少大规模的临床分离株验证,而且难以实现临床标本中细菌的免分离检测。该文对 RAST 技术的临床验证、可重复性评估、临床适用性评估、准确性评估、拉曼光谱与电阻抗及微流控技术的创新结合及其在复杂临床标本中直接药敏检测等方面进行展望。

关键词:拉曼光谱; 快速药敏检测; 细菌; 光学; 微流控

中图分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)04-0542-06

Advances in Raman spectroscopy for rapid drug susceptibility testing^{*}

YANG Wenxu,ZHANG Xinyu,LIU Xu,LIU Yu[△]

Department of Clinical Laboratory,the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University,Harbin,Heilongjiang 150000,China

Abstract:Pathogenic bacteria pose a major threat to human health,and the abuse of antibiotics has led to the development and spread of bacterial resistance. At present,the commonly used antimicrobial susceptibility testing in clinical microbiology laboratory,such as disk diffusion method,concentration gradient strip diffusion method,broth dilution method and automatic antimicrobial susceptibility analysis are based on bacterial growth methods,and the operation process is cumbersome,which takes 8—16 hours to get the results. This review focuses on the research progress of Raman spectroscopy in the field of rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST). The detection time of metabolic phenotype-based antimicrobial susceptibility testing by Raman spectroscopy is significantly shorter than that of the conventional growth-based antimicrobial susceptibility testing. However,this method lacks large-scale validation of clinical isolates,and it is difficult to achieve the isolation free detection of bacteria in clinical samples. In this paper,the clinical validation,repeatability evaluation,clinical applicability evaluation,accuracy evaluation,innovative combination of Raman spectroscopy with electrical impedance and microfluidic control technology,as well as its direct antimicrobial detection in complex clinical samples are prospected.

Key words:Raman spectroscopy; rapid antimicrobial susceptibility testing; bacteria; photology; microfluidic control

细菌感染每年导致全球 800 多万人死亡,占有所有报告的与感染有关的死亡人数的 50% 以上^[1]。在得到准确的药敏结果前,30%~50% 的细菌感染患者接受的一线抗菌药物治疗无效,而且每延迟 1 h 给予正确的抗菌药物治疗,患者的存活率就会下降 10%^[2-4]。为了缩短药敏检测时间,各种快速药敏检测(RAST)方法被开发出来,如基于光学、电阻抗、微流控、质谱及拉曼光谱等原理的技术,这些技术主要是基于细菌

生长或代谢表型的药敏检测。但由于不同细菌繁殖速度存在差异,基于细菌生长的技术可能受限,在抗菌药物作用下,细菌代谢表型的变化会更快。以细菌代谢表型检测为目的的基于拉曼光谱的药敏检测技术已被证明是有前途的 RAST 替代方案^[5-7]。本文分析细菌耐药性的流行病学现状和 RAST 发展现状,进一步讨论基于细菌代谢表型检测的拉曼光谱在 RAST 方面的研究进展,为 RAST 的研究提供新

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(82272389)。

[△] 通信作者,E-mail:rainfall1982@163.com。

思路。

1 RAST 发展现状

1.1 基于光学原理的 RAST 方法 ZHANG 等^[8]通过大体积溶液散射成像(LVSI)系统直接对临床尿液标本成像,并使用单细胞分裂跟踪方法分析尿液病原菌图像,在 60 min 内就得到了药敏结果,与金标准药敏结果完全一致。CANSIZOGLU 等^[9]开发了一种快速超灵敏探测器(RUSD)药敏检测平台,可以检测到极低细胞密度的细菌,在 2~4 h 内可测得常用抗菌药物对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的最低抑制浓度(MIC)。

1.2 基于电阻抗原理的 RAST 方法 HANNAH 等^[10]用琼脂糖基水凝胶沉积物修饰丝网印刷电极,将敏感和耐药的金黄色葡萄球菌菌株置于含有抗菌药物的电极上,利用电化学阻抗谱(EIS)和差分脉冲伏安法(DPV)监测细菌生长并建立生长曲线,在 45 min 内即可区分敏感菌和耐药菌。PITRUZZELLO 等^[11]基于电阻抗可直接检测活细菌代谢的原理,研究抗菌药物处理下单个细菌的电反应,可在 30~60 min 内测得药敏结果。

1.3 基于微流控技术的 RAST 方法 LI 等^[12]开发了一种在单细胞水平进行快速病原体分类和药敏试验的适应性微流控系统,通过结合可调微流体阀和实时光学检测,细菌被捕获并根据其物理特征进行分类,在单细胞水平监测它们在抗菌药物作用下的生长,最短 30 min 就可以确定细菌的耐药性。KAN-DAVALLI 等^[13]也提出了一种在微流控芯片中基于单细胞水平的药敏检测方法,该研究使用 4 种抗菌药物和 7 种细菌的混合标本进行检测,可在 2 h 内确定混合标本中各种细菌的药敏谱。

1.4 其他 RAST 方法 ZHANG 等^[14]通过核苷酸胶体染料(SYBR Green I)和碘化丙啶(PI)染色,在 30~60 min 内检测到 100 株肺炎克雷伯菌临床分离菌株对 4 种不同抗菌药物的耐药性。KÁLLAI 等^[15]提出了一种基于流式细胞术的 RAST 方法,在培养 4 h 后就能观察到细菌的生长,药敏结果的准确率在 87%以上。LI 等^[16]采用基质辅助激光解吸/电离时间飞行质谱法(MALDI-TOF MS)检测了大肠埃希菌在有黏菌素条件下的生长状况,大肠埃希菌与抗菌药物孵育 2 h 后,根据敏感株和耐药株之间的相对生长值测定了黏菌素的 MIC。YANG 等^[17]以肺炎克雷伯菌和环丙沙星为细菌-抗生素模型,采用 RNA 测序技术确定了细菌暴露于抗菌药物后的 RNA 标志物用于药敏检测,肺炎克雷伯菌暴露于环丙沙星 10 min 就可检测到 RNA 标志物的变化,然后通过实时定量 PCR 在 11 株肺炎克雷伯菌分离株中进行验证,准确度良好。

2 拉曼光谱的基本原理及优势

拉曼光谱基于非弹性散射原理,是一种非侵入性光谱技术,可用于分子表征和成像,具有高空间分辨率。在生物学中,它特别适用于生物分子的鉴定和细胞的光谱特征分析^[18]。传统的拉曼光谱信号强度低、抗干扰能力弱,检测时需要较长的积分时间^[19-20],限制了其在 RAST 中的应用。

表面增强拉曼光谱(SERS)相比于自发拉曼光谱,有高灵敏度的优点^[21],其基于离域电子集体相干振荡导致的激光与电磁场耦合,在金属纳米结构之间的间隙连接处或纳米间隙处通过局部表面等离子体共振产生“热点”,从而产生强大的局部电磁场聚焦增强^[22],可以将吸附在金或银纳米粒子上分子的拉曼信号增强 $10^{10} \sim 10^{14}$ 倍^[23]。

共聚焦拉曼光谱(CRS)能有效消除焦平面外的信号干扰,其空间分辨率、信噪比、精度等性能均高于普通拉曼光谱,它与显微技术联用,结合可移动的扫描平台,可在三维空间中精确定位样品和成像^[24]。受激拉曼光谱(SRS)是一种无损的、无标记的振动光谱学方法,通过相干激发分子键振动并保留光谱指纹,克服了传统的自发拉曼散射固有缺点,可实现高速、高化学特异检测^[25-26]。此外,SRS 成像比传统自发拉曼成像速度快 1 000 倍以上,且不受样品自发荧光干扰^[27]。

3 拉曼光谱技术在 RAST 领域中的应用

3.1 基于单细菌分子表型的 RAST 基于单细菌分子表型的 RAST 可以省去细菌增殖所需时间。目前,基于单细胞水平的快速分子表型的药敏检测,主要依赖于活细菌对重水(D₂O)的代谢摄入,生成细菌内部的生物分子,比如脂质和蛋白质等,通过检测 C-D 峰的强度可以实现抗菌药物 MIC 的快速检测。

C-D 峰位于拉曼光谱的 2 040~2 300 cm⁻¹ 波段,该波段通常在未进行 D₂O 标记的细菌中无可检测到的拉曼峰,具有高特异性。见图 1^[28]。此外,在含有 D₂O 的培养基中生长的细菌 C-D 峰的强度变化与活细菌的代谢活性呈正相关^[5,7,29-31]。

任何活细菌的代谢都需要水,因此,在含有 D₂O 的培养基中生长的活细菌都会生成代谢表征的 C-D 峰,这决定了 C-D 峰可作为分辨单细菌细胞代谢活动的通用生物标志物。在基于培养的药敏检测方法中,细菌增殖一代的时间比开始现代代谢表征的时间长,而且不同种细菌的生长时间差异也会使药敏时间难以缩短,因此,基于 C-D 峰的单细胞拉曼药敏检测方法在 RAST 领域中有极好的应用前景。

在目前的研究中,运用单细胞拉曼技术进行 MIC 的快速测定大致分为 3 步:(1)细菌在含有不同浓度梯度抗菌药物的培养基中先孵育 1~2 h;(2)按体积

比向培养基中加入 D₂O(目前报道 30%~100% D₂O 浓度),同时保证培养基浓度和药物浓度与初始一致,继续孵育 30 min 左右;(3)根据耐药组和敏感组的相对 C-D 比,即 C-D/(C-H+C-D)来设定 cut off 值以测定 MIC。

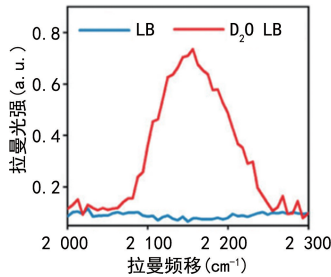


图 1 铜绿假单胞菌在正常和含 D₂O 的培养基中培养 3 h 后的 SRS 光谱

3.1.1 运用 CRS 技术进行 RAST TAO 等^[32]证明了基于 D₂O 活菌代谢标记的单细胞拉曼光谱可以检测细菌对抗菌药物的反应,2 040~2 300 cm⁻¹波段的 C-D 拉曼带可作为单细菌代谢活性的通用生物标志物。YANG 等^[5]开发了适用于临床尿液标本直接药敏检测的单细胞拉曼光谱技术,基于活菌的 D₂O 代谢掺入,通过相对 C-D 比设置 S/R 截止值用于药敏结果判读,达到了从接收尿液标本到结果读取总检测时间缩短至 2.5 h,且准确度高的效果。YUAN 等^[33]将 31 株伊丽莎白白菌分别与 8 种不同浓度抗菌药物和 40% D₂O 共孵育,4 h 即可测定抗菌药物的 MIC,除头孢吡肟外,其他 7 种抗菌药物的单细胞拉曼药敏结果与金标准药敏结果一致率为 94%。在该研究中,头孢吡肟所测药敏结果与金标准结果不一致可能是因为不生长但代谢活跃的细菌存在,这种特性可能会影响药敏结果的准确性,也会成为细菌感染治疗后复发的根源^[33]。因此,临床可以通过单细胞拉曼药敏检测技术来评估抗菌药物疗效,更好地指导临床给药。

3.1.2 运用 SRS 技术进行 RAST 快速准确的药敏

试验对于多药耐药菌的安全、有效和环境友好型治疗至关重要^[34]。ZHANG 等^[20]利用飞秒受激拉曼散射成像对经过 70% D₂O 培养基和不同浓度抗菌药物孵育后的细菌进行单细胞成像,在不到 2.5 h 测定了 14 种抗菌药物对临床常见 8 种病原菌的 MIC 值,与金标准药敏结果的符合率为 94.6%。此外,该研究制备了模拟尿液和血液标本,通过直接过滤的方法分离细菌进行药敏检测,准确度良好。此外,ZHANG 等^[28]在单细胞水平上,通过 SRS 成像监测抗菌药物作用下的 D₂O 活菌代谢掺入,在 2.5 h 内测得抗菌药物的单细胞代谢失活浓度。该方法还适用于尿液或血液等复杂生物标本的直接 RAST。

3.2 基于多细菌分子表型的 RAST 虽然基于单细菌分子表型的 RAST 方法具有一定优势,但由于细菌是活体,同种菌的不同个体状态在不同时间或空间可能不同,这会影响药敏结果的准确性。因此,有研究者开发了基于多细胞水平分子表型检测的 RAST 方法,这种方法主要依赖于 SERS 技术。CHANG 等^[35]开发了集成膜过滤和 SERS 活性衬底的微流控系统,微通道内腔室的膜可过滤和浓集细菌,注射泵将培养基、抗菌药物和洗涤液等注入其中,在过滤室中培养细菌,细菌释放的代谢物被输送到附着 SERS 衬底的微通道中进行检测,药敏检测时间明显缩短。FU 等^[36]筛得一种带负电荷的适配子,与细菌特异性结合,利用粗糙金属纳米颗粒的信号放大作用,测定了大肠埃希菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌在不同浓度抗菌药物作用下的拉曼光谱,首次发现 735 cm⁻¹可作为标志峰位置,基于此峰强度的变化,在 1 h 内可测得药物的 MIC。HILTON 等^[37]将纳米银颗粒印在 SERS 纸传感器上,利用便携式拉曼光谱仪对不同 β-内酰胺类抗菌药物耐药的大肠埃希菌进行检测,在 2.5 h 内即可完成大肠埃希菌的耐药分析。新型 RAST 技术汇总见表 1。

表 1 新型 RAST 技术汇总

方法	简述	标本类型	时间	细菌	特点	是否为单细胞	生长/代谢	参考文献
光学	大体积溶液散射成像和单细胞分裂跟踪法	尿液	1 h	大肠埃希菌	准确度高,灵敏度高;缺乏临床标本验证	是	生长	[8]
光学	RUSD	纯培养菌落	2~4 h	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌	可测定 MIC,灵敏度高,成本低;缺乏临床标本验证	否	生长	[9]
EIS+DPV	含抗菌药物的琼脂糖基水凝胶沉积物修饰丝网印刷电极	纯培养菌落	45 min 至 2.5 h	金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌	灵敏度高,成本低、重复性好;不适于生长慢的细菌	否	生长	[10]
EIS+微流控	电阻抗可直接检测活细菌代谢	纯培养菌落	30 ~ 60 min	大肠埃希菌	可测定 MIC,灵敏度高;缺乏临床标本验证	是	代谢	[11]

续表 1 新型 RAST 技术汇总

方法	简述	标本类型	时间	细菌	特点	是否为 单细胞	生长/ 代谢	参考 文献
微流控	在微流控芯片中基于单细胞水平的药敏检测	尿液、全血、不同细菌混合样品	2 h	大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌等	设备简单,混合细菌标本直接检测;对初始菌量有要求	是	生长	[12][13]
化学染色	SYBR Green I和 PI 的活细菌染色	纯培养菌落	30 ~ 60 min	肺炎克雷伯菌	操作简单,准确度高;缺乏临床标本验证	否	生长	[14]
流式细胞术	监测抗菌药物作用下细菌的生长	纯培养菌落	4 h	大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等	可测定 MIC,成本低,重复性好,准确度高;缺乏临床标本验证	否	生长	[15]
质谱	监测细菌在有/无黏菌素条件下的生长	纯培养菌落	2 h	大肠埃希菌	可测定 MIC,操作简单,灵敏度高;成本高,仅研究了多黏菌素耐药基因(mcr)阳性或 mcr 阴性大肠埃希菌	否	生长	[16]
RNA 测序	确定细菌暴露于环丙沙星后的 RNA 标志物	纯培养菌落	10 min	肺炎克雷伯菌	可测定 MIC,准确度高;流程复杂,需要高接种量	否	代谢	[17]
CRS/CRS 显微技术	细菌代谢掺入 D ₂ O,检测 C-D 带强度	纯培养菌落、尿液	0.5~4.0 h	常见口腔感染细菌、尿路感染细菌和血流感染细菌	可测定 MIC,可区分活菌和死菌,准确度高,灵敏度高,可以成像;缺乏临床标本验证	是	代谢	[5][31][32]
SRS/SRS 显微技术	细菌代谢掺入 D ₂ O,检测 C-D 带强度	纯培养菌落、尿液、全血	2.5~3.0 h	常见尿路感染细菌和血流感染细菌	可测定 MIC,灵敏度高、可飞秒成像;缺乏临床标本验证	是	代谢	[34][35]
SERS 技术	检测特定拉曼峰强度变化	纯培养菌落	1.0~2.5 h	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌	可测定 MIC,成本低,灵敏度高,护理点检测;缺乏临床标本验证	否	代谢	[36][37][38]

4 结论与展望

基于细菌生长和代谢表型的 RAST 技术相较于传统药敏方法的检测时间明显缩短,其中,运用拉曼光谱技术在细菌代谢表型水平进行 RAST 具有很好的应用前景。

虽然微流控、电阻抗和 SYBR Green I 活菌染色等技术平均药敏检测时间为 1 h 左右,但适用的细菌和抗菌药物都比较局限,也无法识别菌群中的异耐药菌,而且检测结果的准确性缺乏大标本量的验证。此外,这些基于生长的药敏检测对细菌的初始接种量有要求,而且细菌在刚接种到培养基中会经历 1~3 h 的迟缓期,很难检测到数量上的微弱变化,还易受到细菌本身状态和环境等因素的影响。

基于 RNA 测序的药敏检测目前只对环丙沙星作用于大肠埃希菌有研究,虽然其属于细菌代谢表型检测的 RAST,但操作复杂,初始菌量要求高,难以满足临床要求。基于单细菌和多细菌代谢表型的 RAST 技术准确度高、灵敏度高,但仍有许多不足之处:(1)

缺乏大规模临床分离株和抗菌药物的验证;(2)缺乏标准化的检测流程、不能做质控和室间比对等;(3)细菌个体的异质性会影响单细菌药敏检测的准确性;(4)对于 SERS 的药敏检测,增强基底合成复杂,容易受到残留培养基和其他成分的干扰,可重复性低等;(5)适用的标本类型局限于纯培养菌落、尿液和全血标本,而对于复杂的痰液、粪便等标本的直接药敏检测鲜有研究。

未来还需要对基于细菌生长和代谢表型检测的 RAST 技术进行大量的临床分离株和抗菌药物验证,并对检测结果的准确性进行评估;其次是标本处理流程的标准化,做好质控和室间比对,提高检测的可重复性和临床适用性;进行拉曼光谱药敏检测时要引入合适的内标,消除复杂因素对检测的影响,也可以将拉曼光谱与电阻抗、微流控、化学染色等技术相结合,开发更快、更准确、重复性更好的 RAST 方法,实现在复杂标本中直接进行细菌快速鉴定及药敏检测。

参考文献

- [1] FURST A L, FRANCIS M B. Impedance-Based detection of bacteria[J]. *Chem Rev*, 2019, 119(1): 700-726.
- [2] LI Y Y, YANG X, ZHAO W A. Emerging microtechnologies and automated systems for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing[J]. *SLAS Technol*, 2017, 22(6): 585-608.
- [3] KUMAR A, ROBERTS D, WOOD K E, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock[J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(6): 1589-1596.
- [4] LUNA C M. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia[J]. *Eu Respir J*, 2006, 27(1): 158-164.
- [5] YANG K, LI H Z, ZHU X, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing of pathogenic bacteria using Heavy-Water-Labeled Single-Cell raman spectroscopy in clinical samples[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(9): 6296-6303.
- [6] BAUER D, WIELAND K, QIU L, et al. Heteroresistant bacteria detected by an extended Raman-Based antibiotic susceptibility test[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(13): 8722-8731.
- [7] YI X F, SONG Y Z, XU X G, et al. Development of a fast Raman-Assisted antibiotic susceptibility test (FRASST) for the antibiotic resistance analysis of clinical urine and blood samples[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(12): 5098-5106.
- [8] ZHANG F N, JIANG J P, MCBRIDE M, et al. Direct antimicrobial susceptibility testing on clinical urine samples by optical tracking of single cell division events[J]. *Small*, 2020, 16(52): e2004148.
- [9] CANSIZOGLU M F, TAMER Y T, FARID M, et al. Rapid ultrasensitive detection platform for antimicrobial susceptibility testing[J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(5): e3000291.
- [10] HANNAH S, ADDINGTON E, ALCORN D, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing using low-cost, commercially available screen-printed electrodes[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 145: 111696.
- [11] PITRUZZELLO G, JOHNSON S, KRAUSS T F. Exploring the fundamental limit of antimicrobial susceptibility by near-single-cell electrical impedance spectroscopy[J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 224: 115056.
- [12] LI H, TORAB P, MACH K E, et al. Adaptable microfluidic system for single-cell pathogen classification and antimicrobial susceptibility testing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(21): 10270-10279.
- [13] KANDAVALLI V, KAREMPUDI P, LARSSON J, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing and species identification for mixed samples[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6215.
- [14] ZHANG Y B, FAN W H, SHAO C H, et al. Rapid determination of antibiotic resistance in klebsiella pneumoniae by a novel antibiotic susceptibility testing method using SYBR green I and propidium iodide double staining[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 650458.
- [15] KÁLLAI A, KELEMEN M, MOLNÁR N, et al. MICy: a novel flow cytometric method for rapid determination of minimal inhibitory concentration[J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0090121.
- [16] LI J P, HUANG Y L, HU Y Y, et al. A rapid MALDI-TOF mass spectrometry-based method for colistin susceptibility testing in *Escherichia coli*[J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(2): 528-534.
- [17] YANG X, HASHEMI M M, ANDINI N, et al. RNA markers for ultra-rapid molecular antimicrobial susceptibility testing in fluoroquinolone-treated *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(7): 1747-1755.
- [18] PEZZOTTI G. Raman spectroscopy in cell biology and microbiology[J]. *J Raman Spectrosc*, 2021, 52(12): 2348-2443.
- [19] OSELEDCHYK A, ANDREOU C, WALL M A, et al. Folate-Targeted Surface-Enhanced resonance raman scattering nanoprobe ratiometry for detection of microscopic ovarian cancer[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2): 1488-1497.
- [20] ZHANG M, HONG W L, ABUTALEB N S, et al. Rapid determination of antimicrobial susceptibility by stimulated raman scattering imaging of D₂O metabolic incorporation in a single bacterium[J]. *Adv Sci*, 2020, 7(19): 2001452.
- [21] LI H M, WANG Q, TANG J, et al. Establishment of a reliable scheme for obtaining highly stable SERS signal of biological serum [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 189: 113315.
- [22] DING Q Q, WANG J, CHEN X Y, et al. Quantitative and sensitive SERS platform with analyte enrichment and filtration function[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(10): 7304-7312.
- [23] SONG C Y, JIANG X Y, YANG Y J, et al. High-Sensitive assay of nucleic acid using tetrahedral DNA probes and DNA concatamers with a surface-enhanced raman scattering/surface plasmon resonance dual-mode biosensor based on a silver nanorod-covered silver nanohole array[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(28): 31242-31254.
- [24] KONG L B, SETLOW P, LI Y Q. Direct analysis of water content and movement in single dormant bacterial spores using confocal Raman microspectroscopy and Raman imaging[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(15): 7094-7101.
- [25] HU F H, SHI L X, MIN W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(9): 830-842.
- [26] CHENG J X, XIE X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [27] MIN W, FREUDIGER C W, LU S, et al. (下转第 567 页)

- [3] 胡抢,陈剑,孙元水,等. 医源性致自发性食管破裂 1 例[J]. 浙江医学,2021,43(5):551-552.
- [4] 刘妍,张鸣青,李佩,等. 自发性食管破裂内镜下治疗 1 例[J]. 四川医学,2020,41(6):664-665.
- [5] 胡波,李辉. 12 例自发性食管破裂诊治体会[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(71):223.
- [6] 杨森. 与双侧胸腔相通的自发性食管破裂 1 例分析[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(68):262.
- [7] 李建忠,赵锋,张晋,等. 44 例食管破裂患者的临床诊疗研究[J]. 西南国防医药,2020,12(2):131-133.
- [8] 杨扬,何朝晖. 隐匿性食管穿孔并发纵隔脓肿 1 例诊治体会[J]. 胃肠病学,2020,25(12):767-768.
- [9] 王宇飞,吴永坤,郭占林. 食管破裂的诊断及治疗[J]. 内蒙古医科大学学报,2022,64(4):396-399.
- [10] 牛磊,费爱华,吴增斌,等. 自发性食管破裂一例误诊分析并文献复习[J]. 临床误诊误治,2014,40(10):27-30.
- [11] 王其彰. 食管外科[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:31-35.
- [12] 陈新隆,王平,毛新. 自发性食管破裂 16 例[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2005,12(1):18.
- [13] GARAS G,ZAROGULIDIS P,EFTHYMIU A,et al. Spontaneous esophageal rupture as the underlying cause of pneumothorax;Early recognition is crucial[J]. J Thorac Dis,2014,6(12):1655-1658.
- [14] YU L L,MIAO D,ZHOU J C,et al. Analysis of the new "three tubes" method in the treatment of spontaneous esophageal rupture[J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi,2018,57(8):588-591.
- [15] YU L L,HE Z F,LIU Q F,et al. Two-tube method for treatment of spontaneous esophageal rupture and concomitant mediastinal infection[J]. Intern Med J,2018,46(4):1528-1536.
- [16] KOPELMAN Y,ABU BAKER F,TROIZA A,et al. Boerhaave syndrome in an elderly man successfully treated with 3-month indwelling esophageal stent[J]. Radio Case Rep,2018,13(5):1084-1086.
- [17] NAKANO T,ONODERA K,ICHIKAWA H,et al. Thoracoscopic primary repair with mediastinal drainage 1s a viable option for patients with Boerhaave's syndrome[J]. J Thorac Dis,2018,10(2):784-789.
- [18] 张新波,王鹏鲲,宋和平,等. 食管破裂诊断及外科手术方式的选择:附 36 例临床分析[J]. 河南外科学杂志,2013,19(2):11-13.
- [19] 张国良. 实用胸部外科学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2007:59-63.
- [20] 吴茅. 常规浆膜积液细胞图谱[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2008:21-25.

(收稿日期:2023-07-13 修回日期:2023-12-12)

(上接 546 页)

- Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy[J]. Annu Rev Phys Chem,2011,62(1):507-530.
- [28] ZHANG M,SELEEM M N,CHENG J X. Rapid antimicrobial susceptibility testing by stimulated raman scattering imaging of deuterium incorporation in a single bacterium[J]. J Vis Exp,2022,180:10.
- [29] ZHANG Z Y,CHEN L,LIU L,et al. Chemical basis for deuterium labeling of fat and NADPH[J]. J Am Chem Soc,2017,139(41):14368-14371.
- [30] SONG Y Z,CUI L,LÓPEZ J Á S,et al. Raman-Deuterium isotope probing for in-situ identification of antimicrobial resistant bacteria in Thames river[J]. Sci Rep,2017,7(1):16648.
- [31] BERRY D,MADER E,LEE T K,et al. Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112(2):E194-E203.
- [32] TAO Y,WANG Y,HUANG S,et al. Metabolic-Activity-Based assessment of antimicrobial effects by D₂O-Labeled Single-Cell raman microspectroscopy [J]. Anal Chem,2017,89(7):4108-4115.
- [33] YUAN S Y,CHEN Y W,LIN K C,et al. Single cell raman spectroscopy deuterium isotope probing for rapid antimicrobial susceptibility test of elizabethkingia spp[J]. Front Microbiol,2022,13:876925.
- [34] ZHU P F,REN L H,ZHU Y,et al. Rapid,automated, and reliable antimicrobial susceptibility test from positive blood culture by CAST-R[J]. mLIFE,2022,1(3):329-340.
- [35] CHANG K W,CHENG H W,SHIUE J,et al. Antibiotic susceptibility test with Surface-Enhanced raman scattering in a microfluidic system[J]. Anal Chem,2019,91(17):10988-10995.
- [36] FU S J,WANG X W,WANG T,et al. A sensitive and rapid bacterial antibiotic susceptibility test method by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Braz J Microbiol,2020,51(3):875-881.
- [37] HILTON S H,HALL C,NGUYEN H T,et al. Phenotypically distinguishing ESBL-producing pathogens using paper-based surface enhanced Raman sensors [J]. Anal Chim Acta,2020,1127:207-216.

(收稿日期:2023-08-16 修回日期:2023-11-29)