

基于表面增强拉曼光谱的致病菌检测方法研究进展

邱训¹, 伏秋月¹, 王鹏¹, 李绍新², 李英^{2*}¹广东医科大学医学技术学院, 广东 东莞 523808;²广东医科大学生物医学工程学院, 广东 东莞 523808

摘要 近年来, 细菌感染性疾病不断发生, 抗生素的频繁使用使得耐药细菌的数量显著增多, 耐药现象愈发严峻。迫切需要一种高效、准确的检测技术来对致病菌作出判断。不同种属细菌其分子组成和结构不同, 表面增强拉曼光谱(SERS)主要由于其能反映细菌特有的光谱指纹而被用于区分和反映细胞状态。SERS对致病菌的检测受到多个因素的影响, 本文从三个方面回顾了SERS对致病菌的检测并做一简要综述: 首先, 从基底的设计方面, 总结了不同结构和大小的SERS基底对致病菌的检测; 其次, 回顾了致病菌的共培养、原位还原和静电结合的非标记检测方式以及标记检测包括外标记和内标记方法对致病菌的SERS检测; 最后, 结合致病菌拉曼光谱分析方法即传统的多变量统计分析方法和先进的机器学习算法对致病菌加以鉴定并对SERS用于致病菌检测进行了总结和展望。

关键词 光谱学; 表面增强拉曼光谱; 致病菌; 标记法; 非标记法

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1800002

Advances in Detection Methods of Pathogenic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectra

Qiu Xun¹, Fu Qiuyue¹, Wang Peng¹, Li Shaoxin², Li Ying^{2*}¹School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China;²School of Biomedical Engineering, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

Abstract In recent years, bacterial infectious diseases have been occurring, and the frequent use of antibiotics has led to a significant increase in the number of drug-resistant bacteria, and the phenomenon of drug resistance is becoming more and more serious. There is an urgent need for an efficient and accurate detection technology to make a judgment on the pathogenic bacteria. Different species of bacteria have different molecular compositions and structures. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is used to distinguish and reflect the cellular state mainly due to its ability to reflect the unique spectral fingerprint of bacteria. The detection of pathogenic bacteria by SERS is influenced by several factors, and this paper introduces three aspects of SERS detection of pathogenic bacteria and provides a brief review. Firstly, the design of substrates is summarized in terms of different structures and sizes of SERS substrates for pathogenic bacteria. Secondly, the co-culture, in situ reduction and electrostatic binding of pathogenic bacteria for non-labeling detection and labeling detection including external and internal labeling methods for SERS detection of pathogenic bacteria are reviewed. Finally, the identification of pathogenic bacteria is combined with the traditional multivariate statistical analysis method of Raman spectroscopy of pathogenic bacteria and advanced machine learning algorithms, and the application of SERS in pathogenic bacteria detection is summarized and prospected.

Key words spectroscopy; surface-enhanced Raman spectroscopy; pathogenic bacteria; label method; label-free method

1 引言

近年来, 细菌感染性疾病不断发生, 抗生素的频繁使用使得耐药现象愈发严峻。纽约大学最新研究表

明, 细菌耐药性的产生远比预想的容易 100 倍, 正如 Shankar^[1]所报道, 细菌抗生素的耐药性, 已然成为挥之不去的社会问题。快速、可靠地鉴定病原菌是医疗保健、食品和环境安全、防止生物恐怖主义等许多领域

收稿日期: 2021-06-17; 修回日期: 2021-07-06; 录用日期: 2021-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(11404069)

通信作者: *liying@gdmu.edu.cn

面临的巨大挑战^[2-3],目前临床上常用的方法主要有生化鉴定、血清型鉴定、分子生物学检测等,这些方法具有高度的特异性和选择性,但也存在一定的局限,如对检测设备要求高、分型耗时、难以区分相近的血清型,需要较长的时间对细菌培养富集后才能检测^[4],难以应对突发的公共卫生和安全事件^[5]。质谱技术是近年发展起来的一种新型的软电离生物质谱,用于分析细菌的化学分类和鉴定,具有高灵敏度和高质量检测范围等优点,但不同的培养条件,如温度和培养基,也可能影响光谱的质量和相应的鉴定^[6],因此,需要一种致病菌耐药性的快速高灵敏检测技术来实现细菌感染的快速诊断^[7]。表面增强拉曼光谱(SERS)具有无损分析、样品制备简单和对不同分析物可进行超灵敏检测等特点而成为一种快速的检测技术^[8]。

SERS是一种分子振动光谱,可以反映分子的结构特征,表面增强拉曼散射的产生主要是由于导电纳米结构中电子的共振振荡导致局域电磁场的极大增强(即局域表面等离子体共振)^[9],由于贵金属纳米结构提供了巨大的电磁增强,在接近这些等离子体结构的分子中,拉曼信号可以增强 $10^4\sim 10^{10}$ 倍。相比于常规拉曼光谱信号弱、灵敏度低等^[10],利用SERS可获得细菌的振动光谱,其灵敏度和分辨率高,这使得对细菌的多组分分析成为可能^[3]。但是SERS对致病菌的检测存在光谱的重复性低、热点不稳定等问题^[11],由此,本文总结了三个方面的改进:一是改进基底的设计,通过控制基底的结构和大小,获得更高密度和维度的热点;

二是构建特异性更高的探针分子,获得更高拉曼信号的SERS;三是不同物种间光谱差异较小,比较了传统的多变量统计分析方法和先进的机器学习方法对光谱敏感性和特异性识别的差异。最后对SERS用于致病菌检测进行了总结和展望。

2 SERS基底的设计

基底对SERS的增强效果起着重要作用,在基底上构筑多维度、高密度的“热点”可大幅度增强SERS信号,SERS强度与激光照射区域下的SERS热点数量成正比^[12],许多研究也都是基于得到更好的“热点”效果而制备出不同的增强基底^[13]。Kahraman等^[14]、Zhou等^[15]利用不同的方法制备了SERS增强基底并对细菌的光谱进行了表征,这些研究表明,不同的增强基底制备方法所获得的SERS具有显著的可变性。

SERS对致病菌的检测中,最常用的是金和银纳米粒子^[16-17],除此之外,也可以通过制备不同结构的纳米粒子,获得优化的SERS体系^[18]。Fan等^[19]采用种子介导生长的方法合成了爆米花状的等离子体金壳铁磁芯纳米颗粒[图1(a)]并在30 min内对沙门氏菌进行了无标记的SERS检测,这种方法为选择性靶向并摧毁多药耐药菌提供了一种新的探索途径。由银纳米棒阵列组成的衬底[图1(b)]测得了不同病原菌的光谱,应用主成分分析(PCA)方法对光谱做了分类,同时还表明,该阵列还具有区分不可活细胞和可活细胞的能力^[20]。Qiu等^[21]借助带负电荷的细菌利用

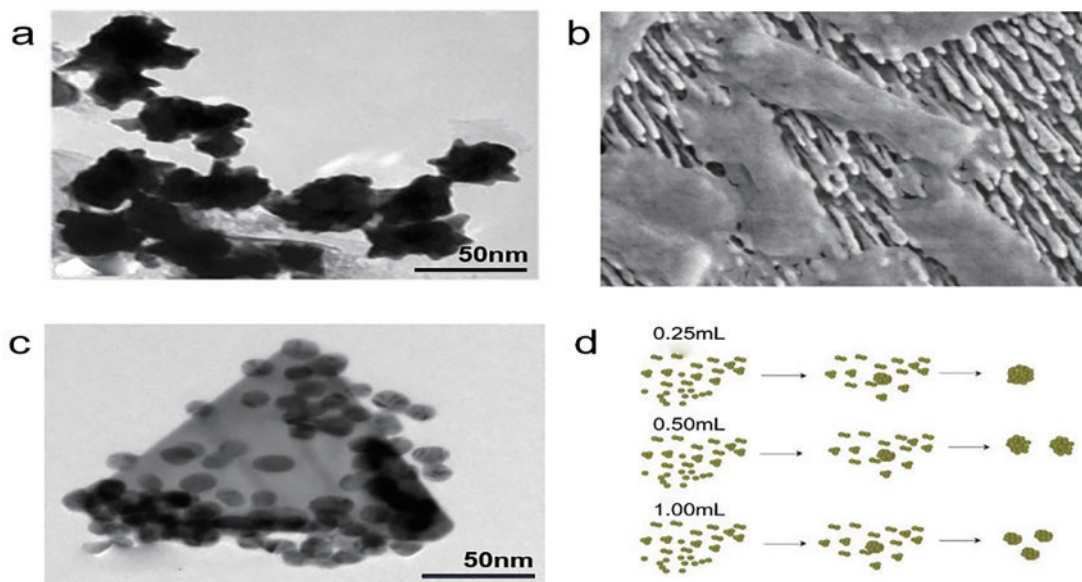


图1 不同结构的SERS基底。(a)新制备的爆米花状磁性核-金壳纳米颗粒的透射电子显微镜(TEM)图像^[19]; (b)大肠杆菌在银纳米棒阵列衬底上的扫描电镜(SEM)图像^[20]; (c)双面TAuNP-AuNSs上层结构与AuNSs高密度分布(13 nm)^[21]; (d)分别加入0.25、0.50、1.00 mL柠檬酸三钠制得不同尺寸金纳米颗粒示意图^[22]

Fig. 1 SERS substrates with different structures. (a) Transmission electron microscope (TEM) image of freshly prepared magnetic core-gold shell popcorn-shaped nanoparticle^[19]; (b) scanned electromirror (SEM) image of escherichia coli on base of silver nanorod array^[20]; (c) two-sided T AuNP-AuNSs upper structure and AuNS high density distribution (13 nm)^[21]; (d) schematic diagram of Au nano-particles of different sizes prepared by adding 0.25, 0.50, 1.00 mL trisodium citrate, respectively^[22]

静电吸引使等离子体双面超结构和柱状纳米棒阵列[图 1(c)]得以组装,并测量了 3 种常见食源性细菌的 SERS,结合三维 PCA 实现了对细菌种类及含有细菌混合物的样品的高敏感度识别。不同结构的 SERS 基底的制备,可以从不同的维度优化 SERS 对致病菌的检测,如缩短检测时间、区分细胞状态以及对细菌混合物的高灵敏识别等,都推动着 SERS 对致病菌的研究进展。

除了不同结构的基底外,不同尺寸的基底对 SERS 的增强效果存在差异,使用相同的试剂,添加顺序和速度的改变都会对基底的尺寸产生影响。如 Yan 等^[11]在合成银纳米粒子时,先滴加 AgNO_3 ,再以 40 mL/min 的速度滴加 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}(\text{NaOH})$ 时会得到更小尺寸的银纳米粒子,使得测量的大肠杆菌的 SERS 更具有重复性。除此之外,添加试剂的比例也会影响粒子的尺寸,如通过控制柠檬酸三钠的加入量得到了不同尺寸的金纳米颗粒[图 1(d)],通过对比 SERS,发现 20 nm 和 50 nm 的金纳米颗粒具有较好的 SERS 效果^[22]。而 Ye 等^[23]采用二元表面活性剂混合

物来提高金纳米棒的尺寸可调节性和单分散性,极大地扩展了金纳米粒子的尺寸,金纳米粒子具有大的整体尺寸,因此具有高散射/吸收比,成为研究等离子体耦合的理想选择。SERS 基底的尺寸受到多个因素的影响,通过不断探索合成过程中添加试剂的速度、比例从而获得了具有更好增强效果的 SERS 基底。

增强基底的制作已经从二维拓展到了三维,材料也从常见的金、银、铜延伸到了石墨烯等^[24],SERS 信号的均匀性和再现性至关重要,这很大程度上取决于 SERS 基底结构的均匀性,要制作出好的 SERS 基底不仅应有足够高的 SERS 活性,同时也应该具备可控制的有序结构。

3 致病菌的检测方式

不同种属细菌结构和生物分子组成存在差异,拉曼光谱用于区分细菌和反映细菌状态主要是由于它能反映细菌特有的光谱指纹。目前,对致病菌的检测方式从总体上可以分为非标记检测和标记检测。两种模式如图 2 所示。

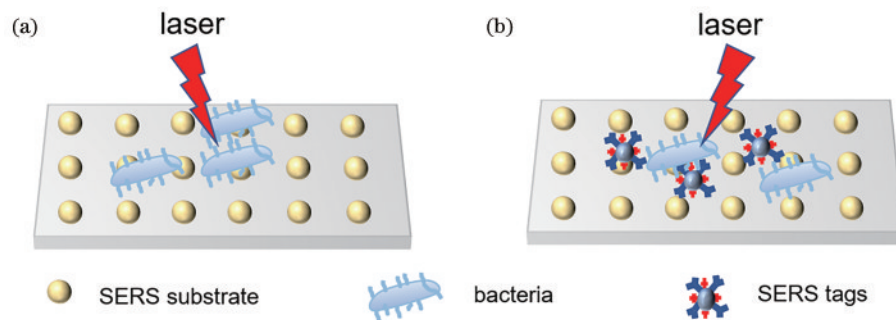


图 2 致病菌的检测方法。(a)非标记方法;(b)标记方法

Fig. 2 Detection methods of pathogenic bacteria. (a) Non-labeling method; (b) labeling method

3.1 基于非标记法对致病菌的检测

非标记法是指通过增强基底直接与细菌细胞结合,获得其特有的内在指纹特征,大多数基于非标记的 SERS 研究都是解释某一细菌的光谱并进行比较或者分类。对于致病菌的无标记检测,目前常用的基于贵金属溶胶和固相基底,与贵金属溶胶共同作用的方法包括共培养、原位还原、静电结合等。

Yang 等^[25]基于 AgNPs 与大肠杆菌孵育培养[图 3(a)],获得了较好的 SERS 效果,并应用该方法对 3 株大肠杆菌进行了统计学分析,不同浓度的大肠杆菌可以通过低至 1×10^5 CFU/mL 的 SERS 图谱来评价。Chen 等^[26]通过在细菌细胞悬浮液中原位合成 AgNPs[图 3(b)]联合近红外 SERS 成功区分了大肠杆菌、铜绿假单胞菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和李斯特菌等几种常见的致病菌。由于抗生素的滥用,多药耐药菌株的出现增加了致病菌的识别难度,为此 Chen 等^[27]提出了利用带正电荷的银纳米颗粒[图 3(c)]表面增强拉曼散射法来鉴定耐甲氧西林的金黄色葡萄球

菌,银纳米颗粒通过静电聚集在细菌表面,SERS 信号得到显著增强。但将细菌和金属溶胶直接混合后检测的方法存在着纳米颗粒分布不均匀而导致测得的光谱重复性较差等问题,因此,Yang 等^[25]在进行银胶体孵化大肠杆菌的检测时,优化了孵育条件包括振荡速度、时间和温度,获得了高灵敏度和重现性的拉曼光谱并结合判别分析方法成功鉴别,而 Yan 等^[11]为了优化 SERS 的增强方法,从离心力、AgNPs 的浓度、AgNPs 的制备、悬浮细胞的溶液离子浓度、细胞密度 5 个方面加以改进,得到了与之前相比更敏感、重复性更好的大肠杆菌 SERS。

基于固相基底的 SERS 检测,Meng 等^[28]开发了一种石墨烯-银纳米颗粒-硅夹芯纳米杂化材料[G@AgNPs@Si,图 3(d)],该平台不仅能够进行分子检测,而且能够在实际系统中进行细胞分析,具有较好的细菌捕获效率和较强的抗菌率,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的识别浓度低至 10^6 CFU/mL,这为设计和制造高质量 SERS 衬底提供了有价值的信息。

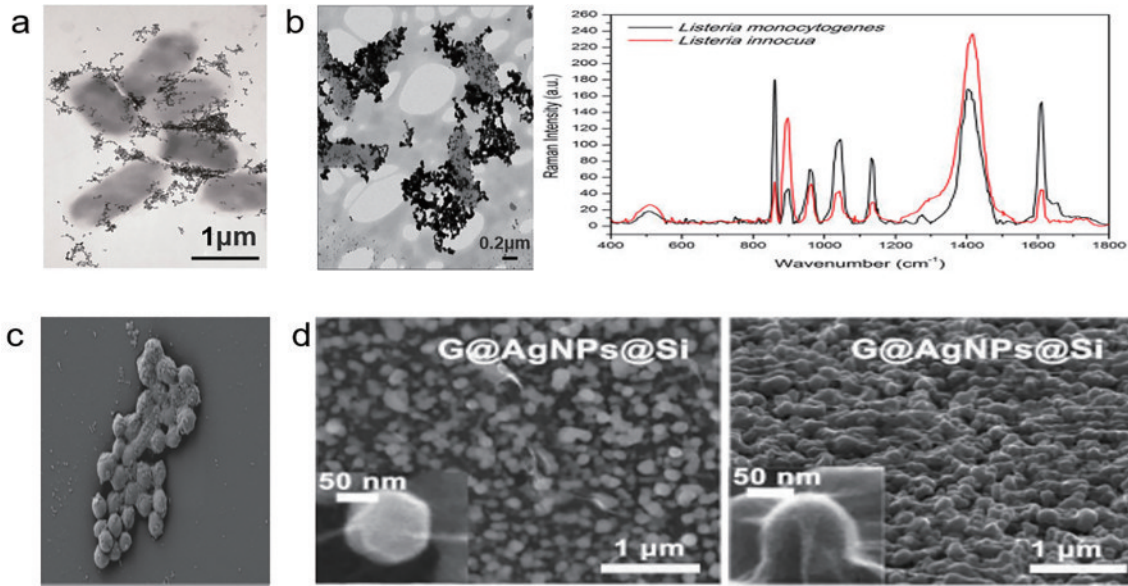


图 3 非标记检测方法。(a) AgNPs-E. coli 样本的 TEM 图像^[25]; (b) 细菌表面 NPs 聚集物的形成(左)和两种李斯特菌的 SERS(右)^[26]; (c) 金黄色葡萄球菌与 AgNPs⁺混合的 SEM 图像^[27]; (d) G@AgNPs@Si 的俯视 SEM 图像(左)和侧视 SEM 图像(右)^[28]
 Fig. 3 Non-labeling detection methods. (a) TEM image of AgNPs-E. coli sample^[25]; (b) formation of NPs aggregate on surface of bacteria (left) and SERS for two species of Listeria (right)^[26]; (c) SEM image of staphylococcus aureus mixed with AgNPs⁺^[27]; (d) SEM images of G@AgNPs@Si from top view (left) and side view (right)^[28]

Premasiri 等^[29]将从尿路感染液中分离的菌株进行培养和富集后置于金纳米颗粒覆盖的二氧化硅衬底上进行 SERS 检测,并在 1 h 内获得了药敏结果,这项研究表明,SERS 有潜力成为一种快速、无生长的尿路感染诊断技术。虽然该固相基底存在着可重复性低、样本容易产生交叉污染等问题,但固相基底的发展使得 SERS 对致病菌的检测时间得以缩短,这对基于固相基底的非标记检测而言是一项重要进展。

3.2 基于标记法对致病菌的检测

标记法是一种间接测量法,是将拉曼报告分子和识别元素直接附着在金属纳米粒子表面,和靶细菌特异性结合后,获得高拉曼信号,在使用标记法对致病菌进行耐药性检测时,要求标记用探针必须具备良好的

特异性^[30],检测也受到 SERS 活性底物、附着分子类型、分子数量等因素的影响^[31]。这种基于探针构建的方式属于 SERS 外标记,包括核酸适配体标记识别探针和抗体标记识别探针,应用同位素标记属于 SERS 内标记,通过直接和靶细菌共同培养,结合 SERS 来表征微生物的表型活性。

1) 基于同位素的标记识别方法:同位素标记法检测细菌常用的除了 ¹⁵N^[32]、¹³C^[33] 等标记分子外,研究表明还可以使用 D₂O 标记,将 D₂O 和含有抗生素的培养基及细菌一起培养不同的时间,在培养过程中,沉默的光谱区域内产生新的 C-D 键[图 4(a)],C-D 键在新合成的生物分子上的形成,在 2040~2300 cm⁻¹ 的强度明显随时间增加,通过比较 C-D 带的光谱变化来区分易

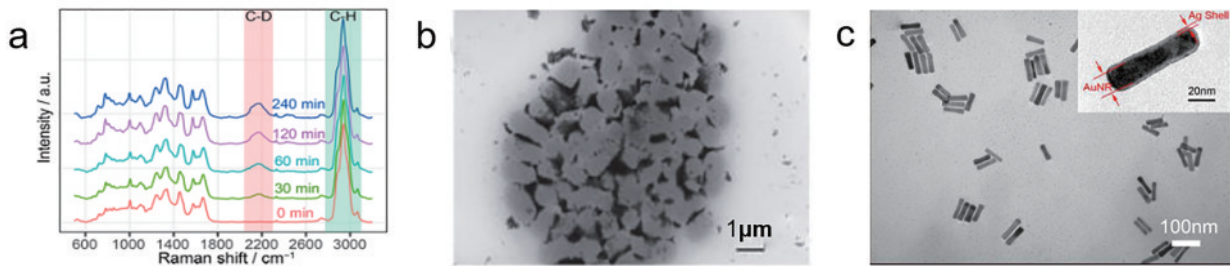


图 4 标记检测方法。(a) 单个大肠杆菌细胞培养时间依赖性的拉曼光谱^[34]; (b) 金纳米粒子的聚集以及 10⁵ CFU/mL MDRB 沙门氏菌存在下微生物团簇的形成^[36]; (c) AuNR-DTNB@Ag 核壳等离子体纳米粒子,插图是单个 AuNR-DTNB@Ag 纳米颗粒的高分辨透射电子显微镜(HRTEM)图像^[41]
 Fig. 4 Labeling detection methods. (a) Incubation time-dependent Raman spectra of single escherichia coli cells^[34]; (b) aggregation of gold nanoparticles as well as formation of microbial clusters in presence of 10⁵ CFU/mL MDRB Salmonella^[36]; (c) AuNR-DTNB@Ag core-shell plasmonic nanoparticles. Inset is high resolution transmission electron microscope (HRTEM) image of single AuNR-DTNB@Ag nanoparticle^[41]

Fig. 4 Labeling detection methods. (a) Incubation time-dependent Raman spectra of single escherichia coli cells^[34]; (b) aggregation of gold nanoparticles as well as formation of microbial clusters in presence of 10⁵ CFU/mL MDRB Salmonella^[36]; (c) AuNR-DTNB@Ag core-shell plasmonic nanoparticles. Inset is high resolution transmission electron microscope (HRTEM) image of single AuNR-DTNB@Ag nanoparticle^[41]

感细胞和耐药细胞^[34]。在此基础上, Yi 等^[35]在最新的研究中提出了快速拉曼辅助抗生素敏感性测试 (FRAST), 结果表明, 随着抗生素剂量的增加, 细胞 C-D 比值下降, 导致细胞代谢受到抑制, 应用于临床尿液检测时, 也展现出了良好的能力。

2) 基于抗体的标记识别探针: 抗体标记识别探针的特点是通过共价结合对细菌特异性进行识别。Khan 等^[36]报道了单克隆抗体结合爆米花形状的金纳米颗粒 [图 4(b)] 能够选择性地检测多重耐药沙门氏菌, 检测限为 10 CFU/mL。Yan 等^[37]将针对大肠杆菌 O157:H7 的独特单克隆抗体 (McAb) 直接连接到金-银-核壳纳米结构的表面, 并结合机器回归模型检测细菌进行准确定量分析, 检测限为 6.94×10^1 CFU/mL, 表明该平台在大肠杆菌 O157:H7 的即时检测中具有重要的潜力。

3) 基于核酸适配体的标记识别探针: 在 SERS 的研究过程中, 适配体因其具有高亲和力和选择性等特点成为基于适配体 SERS 研究致病菌的一个重要方法^[38]。Gao 等^[39]基于适体的原位银纳米颗粒合成, 并通过适配体和细菌的特殊识别, 获得了细菌特殊的 SERS, 特异性识别的适配体显著增强了细菌的 SERS 信号。为了捕获和分离细菌, 在核酸适配体的标记识别探针构建时, 常联合磁性纳米颗粒, 因为磁性纳米颗粒具有较强的磁响应性、一定的机械强度和化学稳定性以及良好的生物相容性^[40], 基于核酸适配体识别的磁辅助 SERS 生物传感器由 SERS 衬底和新的 SERS 标签两部分组成, 该生物传感器对金黄色葡萄球菌的检测限为 10 CFU/mL^[41]。Zhang 等^[42]开发了基于万古霉素和适配体双重识别的敏感表面增强拉曼散射平台, 并利用该平台对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌进行了特异性识别, 并表明该平台在病原体的准确诊断、特别是在临床样本中有潜在的应用。基于适配体的 SERS 检测显示出了高灵敏度、高特异性等优势, 在生物分析中发挥着不可替代的作用。

4 基于化学计量学统计方法对拉曼图谱的处理

由于异质性的存在, 同一菌株的不同细菌个体的指纹是不同的, 不同物种间 SERS 的差异无法用肉眼检查, 因为它们的组成基本相同^[43], 因此需要结合化学计量学统计方法来对光谱进行分类和鉴别, 包括传统的多变量统计分析方法如 PCA、层次聚类分析等和先进的机器学习方法如深度学习, 前者更侧重于提取数据主要特征对光谱进行分类, 而机器学习是通过学习大量光谱数据, 最终构建新的预测模型。

4.1 传统的多变量统计分析方法

Maquelin 等^[44]将近红外 SERS 用于测定固体培养基上的菌落, 使用 PCA 对菌落加以鉴定。PCA 是一种常见的数据分析方式, 常用于高维数据的降维, 可用

于提取数据的主要特征分量, 但在对光谱数据进行分析时需要得到的光谱进行预处理, 如去除背景基线、平滑、归一化等。在细菌耐药性检测方面, PCA 方法的应用在 3.5 h 内成功鉴别了对氨基青霉素敏感和耐药的大肠杆菌^[45]; Liu 等^[46]借助带正电荷的金纳米棒对 4 种假单胞菌进行增强, 联合 PCA 和层次聚类分析对数据进行处理, 可视化假单胞菌的种类分化结果, 线性判别分析的分类准确率达到 100%。Premasiri 等^[29]使用 SERS 快速诊断尿路感染时, 采用偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA) 使菌株识别的敏感性达到了 95%, 特异性达到 99%, 并在 1 h 内获得了分离菌株的药敏谱。

4.2 机器学习的统计分析方法

机器学习是指用某些算法指导计算机利用已知数据得出适当的模型, 并利用此模型对新的情境给出判断的过程, 随着计算机算法的不断发展, 机器学习的统计分析方法由传统的决策树、随机森林等发展到了最先进的深度学习, 但传统的机器学习方法并没有被取代, 如 Yan 等^[47]结合核主成分分析-决策树 (KPCA-DT) 在单细胞水平上对食源性病原体进行了属、种、血清型水平的快速检测, 并表明当菌株在种甚至血清型水平上鉴定时, KPCA-DT 鉴定方法对微差异特征更敏感, 表现出更好的分类性能。曾万聃等^[48]的实验表明, PCA 结合随机森林算法可以用于食源性致病菌的分类, 其准确率高达 91.36%, 这为食源性致病菌的检测提供了新的方法。

深度学习是机器学习领域中一个新的研究方向, 通过学习大量样本数据的内在规律和表示层次最终具有分析学习和建立适当模型的能力。目前基于深度学习的算法主要包括卷积神经网络 (CNN)、残差神经网络 (ResNet) 等, 使用 ResNet 进行计算时, 仅对拉曼光谱进行标准化处理, 不需要扣除荧光背景和噪声^[49]。基于深度学习的这种特点, Ho 等^[50]生成了一个广泛的细菌拉曼光谱数据集, 并应用深度学习方法准确识别 30 种常见的细菌病原体。Ding 等^[51]以金纳米颗粒作为拉曼衬底, 测量了 3 种沙门氏菌的 SERS 光谱, 结合 1 个由 3 个平行 CNN 组成的多尺度 CNN 模型, 实现了 SERS 特征的多维提取, 识别准确率达到 97% 以上, 并表明 SERS 与多尺度 CNN 联合可用于沙门氏菌血清型鉴定, 也可应用于其他病原菌及血清型鉴定。综上所述, SERS 联合机器学习算法在致病菌及其耐药性的检测方面表现出巨大的潜力。

5 总结和展望

SERS 是一种新兴的快速鉴定微生物的技术并广泛应用于微生物的许多领域^[52], 自从应用到致病菌的检测以来, 通过测量病原菌的特定指纹图谱并结合化学计量学手段, 可以实现致病菌种类及其耐药性的鉴定, 而且得到结果的时间也大大缩短。但距离应用到

临床还有许多的困难需要克服,比如所获得光谱的重复性欠佳,从样品上的不同点获得的光谱会产生差异,这可能会导致对数据的处理不准确,难以得到标准光谱对此加以鉴定等。因此,未来的研究需要进一步完善基底的设计,建立标准的拉曼光谱分析库,提升化学计量学统计分析的准确度,使得 SERS 技术能够距离临床应用更近一步。

参 考 文 献

- [1] Shankar P R. Antimicrobial resistance: global report on surveillance[J]. Australasian Medical Journal, 2014, 7: 237.
- [2] Andrei C, Moraillon A, Larquet E, et al. SERS characterization of aggregated and isolated bacteria deposited on silver-based substrates[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(5): 1417-1428.
- [3] Lorenz B, Wichmann C, Stöckel S, et al. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(5): 413-424.
- [4] Hong W L, Karanja C W, Abutaleb N S, et al. Antibiotic susceptibility determination within one cell cycle at single-bacterium level by stimulated Raman metabolic imaging[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(6): 3737-3743.
- [5] Zhou X, Hu Z W, Yang D T, et al. Bacteria detection: from powerful SERS to its advanced compatible techniques[J]. Advanced Science, 2020, 7(23): 2001739.
- [6] Sloan A, Wang G H, Cheng K D. Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing [J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 473: 180-185.
- [7] Puttaswamy S, Gupta S K, Regunath H, et al. A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems[J]. Archives of Clinical Microbiology, 2018, 9(3): 83.
- [8] Nowicka A B, Czaplicka M, Szyborski T, et al. Combined negative dielectrophoresis with a flexible SERS platform as a novel strategy for rapid detection and identification of bacteria[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(7): 2007-2020.
- [9] Moskovits M. Persistent misconceptions regarding SERS [J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2013, 15(15): 5301-5311.
- [10] Jeanmaire D L, van Duyne R P. Surface Raman spectroelectrochemistry: part I. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1977, 84(1): 1-20.
- [11] Yan Y C, Nie Y, An L Y, et al. Improvement of surface-enhanced Raman scattering method for single bacterial cell analysis[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 573777.
- [12] Lee J, Hua B, Park S, et al. Tailoring surface plasmons of high-density gold nanostar assemblies on metal films for surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Nanoscale, 2014, 6(1): 616-623.
- [13] 杨峰, 文枰, 张志强, 等. 柔性表面增强拉曼光谱芯片制备[J]. 中国激光, 2021, 48(1): 0113001.
Yang F, Wen P, Zhang Z Q, et al. Fabrication of flexible surface-enhanced Raman spectroscopy chip[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(1): 0113001.
- [14] Kahraman M, Yazici M M, Sahin F, et al. Reproducible surface-enhanced Raman scattering spectra of bacteria on aggregated silver nanoparticles[J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(5): 479-485.
- [15] Zhou H B, Yang D T, Ivleva N P, et al. SERS detection of bacteria in water by *in situ* coating with Ag nanoparticles[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(3): 1525-1533.
- [16] Ravindranath S P, Wang Y L, Irudayaraj J. SERS driven cross-platform based multiplex pathogen detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 152(2): 183-190.
- [17] Li S, Xu L G, Ma W, et al. Triple Raman label-encoded gold nanoparticle trimers for simultaneous heavy metal ion detection[J]. Small, 2015, 11(28): 3435-3439.
- [18] 邢豪健, 张洁, 尹增鹤, 等. 碳纳米管/银用于高灵敏自标定拉曼检测[J]. 光学学报, 2020, 40(12): 1224001.
Xing H J, Zhang J, Yin Z H, et al. Carbon nanotube/silver used for highly sensitive self-calibrating Raman detection[J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(12): 1224001.
- [19] Fan Z, Senapati D, Khan S A, et al. 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[J]. Chemistry-A European Journal, 2013, 19(8): 2839-2847.
- [20] Chu H, Huang Y W, Zhao Y P. Silver nanorod arrays as a surface-enhanced Raman scattering substrate for foodborne pathogenic bacteria detection[J]. Applied Spectroscopy, 2008, 62(8): 922-931.
- [21] Qiu L, Wang W Q, Zhang A W, et al. Core-shell nanorod columnar array combined with gold nanoplate-nanosphere assemblies enable powerful *in situ* SERS detection of bacteria[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(37): 24394-24403.
- [22] 蒋浩, 张霞, 李立松, 等. 不同尺寸金纳米颗粒的制备及其 SERS 性能[J]. 微纳电子技术, 2019, 56(2): 107-110, 139.
Jiang H, Zhang X, Li L S, et al. Preparation and SERS properties of Au nano-particles with different sizes[J]. Micronanoelectronic Technology, 2019, 56(2): 107-110, 139.
- [23] Ye X C, Zheng C, Chen J, et al. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods[J]. Nano Letters, 2013, 13(2): 765-771.
- [24] Wang P, Zhang W, Liang O, et al. Giant optical response from graphene: plasmonic system[J]. ACS Nano, 2012, 6(7): 6244-6249.
- [25] Yang D T, Zhou H B, Haisch C, et al. Reproducible E. coli detection based on label-free SERS and mapping[J]. Talanta, 2016, 146: 457-463.

- [26] Chen L Y, Mungroo N, Daikuara L, et al. Label-free NIR-SERS discrimination and detection of foodborne bacteria by *in situ* synthesis of Ag colloids[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2015, 13: 45.
- [27] Chen X P, Tang M Q, Liu Y, et al. Surface-enhanced Raman scattering method for the identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using positively charged silver nanoparticles[J]. Mikrochimica Acta, 2019, 186(2): 102.
- [28] Meng X Y, Wang H Y, Chen N, et al. A graphene-silver nanoparticle-silicon sandwich SERS chip for quantitative detection of molecules and capture, discrimination, and inactivation of bacteria[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(9): 5646-5653.
- [29] Premasiri W R, Chen Y, Williamson P M, et al. Rapid urinary tract infection diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): identification and antibiotic susceptibilities[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(11): 3043-3054.
- [30] 杨尹, 梁伟伟, 王小华, 等. 无标记和标记表面增强拉曼光谱技术用于细菌的检测[J]. 分析科学学报, 2019, 35(5): 650-656.
- Yang Y, Liang W W, Wang X H, et al. Label-free and label based surface-enhanced Raman spectroscopy for bacteria detection[J]. Journal of Analytical Science, 2019, 35(5): 650-656.
- [31] Liu Y, Zhou H B, Hu Z W, et al. Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: a review[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 94: 131-140.
- [32] Cui L, Yang K, Zhou G W, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(11): 5793-5800.
- [33] Chisanga M, Muhamadali H, Kimber R, et al. Quantitative detection of isotopically enriched E. coli cells by SERS[J]. Faraday Discussions, 2017, 205: 331-343.
- [34] 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]. Analytical Chemistry, 2019, 91(9): 6296-6303.
- [35] 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]. Analytical Chemistry, 2021, 93(12): 5098-5106.
- [36] Khan S A, Singh A K, Senapati D, et al. Targeted highly sensitive detection of multi-drug resistant Salmonella DT104 using gold nanoparticles[J]. Chemical Communications, 2011, 47(33): 9444-9446.
- [37] Yan S S, Liu C, Fang S Q, et al. SERS-based lateral flow assay combined with machine learning for highly sensitive quantitative analysis of Escherichia coli O157:H7[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(28): 7881-7890.
- [38] Duan N, Chang B Y, Zhang H, et al. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 218: 38-43.
- [39] Gao W C, Li B, Yao R Z, et al. Intuitive label-free SERS detection of bacteria using aptamer-based *in situ* silver nanoparticles synthesis[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(18): 9836-9842.
- [40] Ma X Y, Lin X C, Xu X M, et al. Fabrication of gold/silver nanodimer SERS probes for the simultaneous detection of Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus[J]. Mikrochimica Acta, 2021, 188(6): 202.
- [41] Wang J F, Wu X Z, Wang C W, et al. Magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy for the detection of staphylococcus aureus based on aptamer recognition[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(37): 20919-20929.
- [42] Zhang C, Wang C, Xiao R, et al. Sensitive and specific detection of clinical bacteria via vancomycin-modified FeO@Au nanoparticles and aptamer-functionalized SERS tags[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2018, 6(22): 3751-3761.
- [43] Teixeira A M, Nemeč A, Sousa C. Differentiation of taxonomically closely related species of the genus acinetobacter using Raman spectroscopy and chemometrics [J]. Molecules, 2019, 24(1): 168.
- [44] Maquelin K, Choo-Smith L P, van Vreeswijk T, et al. Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(1): 12-19.
- [45] Bi L Y, Wang X, Cao X W, et al. SERS-active Au@Ag core-shell nanorod (Au@AgNR) tags for ultrasensitive bacteria detection and antibiotic-susceptibility testing[J]. Talanta, 2020, 220: 121397.
- [46] Liu S S, Li H H, Hassan M M, et al. Amplification of Raman spectra by gold nanorods combined with chemometrics for rapid classification of four Pseudomonas [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 304: 58-67.
- [47] Yan S S, Wang S Y, Qiu J X, et al. Raman spectroscopy combined with machine learning for rapid detection of food-borne pathogens at the single-cell level [J]. Talanta, 2021, 226: 122195.
- [48] 曾万聃, 王其, 夏志平, 等. 基于随机森林的食源性致病菌的分类模型训练方法: CN111259929[P]. 2020-06-09.
- Zeng W D, Wang Q, Xia Z P, et al. Recognition of food-borne pathogenic bacteria by raman spectroscopy based on random forest algorithm: CN111259929[P]. 2020-06-09.
- [49] Fang X L, Zeng Q Y, Yan X L, et al. Fast discrimination of tumor and blood cells by label-free surface-enhanced Raman scattering spectra and deep learning[J]. Journal of Applied Physics, 2021, 129(12): 123103.

- [50] Ho C S, Jean N, Hogan C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4927.
- [51] Ding J Y, Lin Q Q, Zhang J M, et al. Rapid identification of pathogens by using surface-enhanced Raman spectroscopy and multi-scale convolutional neural network[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(14): 3801-3811.
- [52] Jarvis R M, Goodacre R. Characterisation and identification of bacteria using SERS[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 931-936.