

引用格式: ZHENG Jiayun, WANG Yikun, NI Jingshu, et al. Research and Design of Bacterial Autofluorescence Detection Device[J]. Acta Photonica Sinica, 2023, 52(6):0617001

郑家运,王贻坤,倪敬书,等. 细菌自体荧光检测装置的研究与设计[J]. 光子学报, 2023, 52(6):0617001

# 细菌自体荧光检测装置的研究与设计

郑家运<sup>1,2</sup>, 王贻坤<sup>2,3</sup>, 倪敬书<sup>2</sup>, 张洋<sup>2</sup>, 黄尧<sup>2,3</sup>, 张元志<sup>2,3</sup>, 王全福<sup>2</sup>, 王霞<sup>2</sup>,  
刘勇<sup>2,3</sup>, 周金华<sup>1</sup>, 董美丽<sup>2</sup>

(1 安徽医科大学 生物医学工程学院, 合肥 230032)

(2 中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所 安徽省生物医学光学仪器工程技术研究中心,  
安徽省医用光学诊疗技术与装备工程实验室, 合肥 230031)

(3 皖江新兴产业技术发展中心, 铜陵 244000)

**摘要:** 细菌感染会造成伤口愈合延迟, 增加患者和医疗卫生系统的负担, 因此非常需要对伤口细菌进行及时检测和适当的处理。基于细菌自发荧光原理, 设计了一种对伤口常见细菌快速检测成像的系统, 可用于辅助识别伤口细菌负荷和判断感染情况, 无需采样培养或染色鉴定。使用智能手机采集细菌荧光图像, 以 405 nm LED 作为细菌激发光源, 配合荧光图像信息提取和定量算法能够快速识别提取图像上的感兴趣区域并对荧光信号进行量化, 定位细菌荧光信号区域。梯度浓度实验证实了荧光强度与细菌浓度高度相关, 荧光强度与浓度之间存在线性关系, 随着细菌浓度的降低, 荧光信号强度呈下降趋势, 系统最小检测限约为  $10^5$  CFU/mL。与传统细菌检测方法相比, 本装置具有操作简单、检测速度快、成本低等特点, 为伤口细菌检测提供了一种新的手段。

**关键词:** 细菌自体荧光成像; 细菌检测; 感染; 图像处理; 细菌量化

中图分类号: TN29

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20235206.0617001

## 0 引言

伤口细菌感染是指由高负荷细菌引起的局部或全身性炎症反应, 严重者可危及生命。无法愈合的伤口不仅增加了患者的经济负担降低了生活质量, 还给医疗卫生系统带来了沉重的负担。传统的感染诊断主要包括白光下肉眼观察临床症状以及微生物采样方法<sup>[1]</sup>, 仅凭肉眼观测临床症状是主观的, 微生物采样培养的方法虽然是目前检测细菌的金标准, 但这种方法得到的结果往往具有一定的延迟性, 可能错过最佳治疗时期。多重聚合酶链式反应(Multiplex Polymerase Chain Reaction, Multiplex PCR)技术在细菌感染检测和鉴定中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>, 但通常需要专业技术人员来操作较为复杂的仪器提取样本基因, 且至少需要几个小时才能得出结果。此外, 微流控技术也被应用在细菌检测上<sup>[3]</sup>, 但需要拭子采样且操作繁琐。假阳性、检测时间长、实验要求高、实验操作繁琐以及昂贵的试剂和设备仍然是细菌检测的痛点。因此, 如果能够无需染色和取样, 直接实现伤口细菌的在体检测, 将为伤口细菌检测提供一种新方法, 为伤口细菌的快速处理提供一种新的选择。

早在 20 世纪 80 年代人们已经发现了细菌的自发荧光现象, 后来随着光谱技术的发展, 人们陆续测得细菌的自发荧光光谱。随着研究的深入, 人们证实了利用细菌荧光光谱可以为临床提供检测依据, 至此人们开展了基于细菌自发荧光特性的各种细菌检测方法。LIU Yu 等<sup>[4]</sup>使用激光诱导荧光光谱(Laser Induced

基金项目: 安徽省科技重大专项 (No. 202103a07020008), 中国科学院合肥物质科学研究院院长基金 (Nos. YZJJZX202009, YZJJ2021GCH05), 安徽省食品药品监督管理局科技创新项目 (No. AHYJ-KJ-202114)

第一作者: 郑家运, zjy6635055@163.com

通讯作者: 刘勇, liuyong@aiofm.ac.cn; 周金华, zhoujinhua@ahmu.edu.cn; 董美丽, dongmeili@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2022-12-27; 录用日期: 2023-02-27

<http://www.photon.ac.cn>

Fluorescence Spectrometry, LIFS)法检测三种常见的食源性细菌(粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及铜绿假单胞菌),发现三种细菌的荧光光谱各有差异,并简单验证了激光功率和荧光强度之间的关系。BHATTA H等<sup>[5]</sup>利用自体荧光光谱法成功区分酵母和细菌,以及不同的酵母物种。OTTOLINO-PERRY K等<sup>[1]</sup>报道了一种便携式细菌荧光成像装置,验证了与拭子采样相比细菌自发荧光检测装置能够大大提高采样有效性。WU Y C等<sup>[6]</sup>报道了一种便携式实时光学检测、识别和干预指导的细菌检测装置,并使用该装置对金黄色葡萄球菌开展了初步研究,验证了细菌荧光强度与细菌负荷的相关性。以上报道,进一步验证了基于细菌自体荧光实现伤口细菌在体检测的可行性,然而如果能够检测伤口细菌存在的同时,实现细菌高负荷区域的提取和量化,则能够更有效帮助临床工作人员直接定位细菌和判断细菌载量,进而为医生用药、清创提供更多信息和参考。

本文搭建了一套细菌自发荧光检测成像系统,用于检测伤口常见细菌。系统使用低成本LED作为光源,搭配窄带滤光片可以有效缩短光源带宽减小反射光对成像系统的干扰。采用智能手机作为成像部件,无需复杂的光路系统就能获得高质量图片,使得系统简单高效,灵敏度高,对于不同强度的细菌荧光响应快速,可在1 min之内检测到细菌荧光的存在。细菌高负荷区域的标定能够指导定点清创,清创完毕之后还可以使用装置进行复查,通过荧光量化结果评估是否达到包扎愈合的标准,可以在一定程度上减少抗生素的使用。

## 1 基本原理及系统设计

在405 nm紫外光激发下,细菌的自发荧光波长在可见光谱中通常位于420~700 nm之间。其中470~550 nm波段的青绿色荧光由假单胞菌生成分泌的铁载体荧光素产生,而600~665 nm波段的红色荧光由细菌病原体产生的卟啉荧光团发出<sup>[7-9]</sup>。伤口常见的细菌包含金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌以及鲍曼不动杆菌等<sup>[10,11]</sup>,其中除了铜绿假单胞菌主要表现为青绿色荧光,其他细菌均表现为红色荧光。

根据上述原理,设计了一种细菌快速成像系统,如图1。考虑到便携式装置要具有低功耗、低发热等特点,采用两个LED作为系统光源,并经过系统均匀性实验验证使用两个LED能够满足成像场均匀性要求。两个LED中心波长为405 nm,半波宽为16 nm,发光角度为60°的紫外LED(UV 405,深圳市信义光电),正常工作电压电流条件为3.3 V、500 mA。与其他光源相比,LED光源具有高光效、低电压控制、低成本以及环保等特性<sup>[12]</sup>,较适合于荧光成像系统。

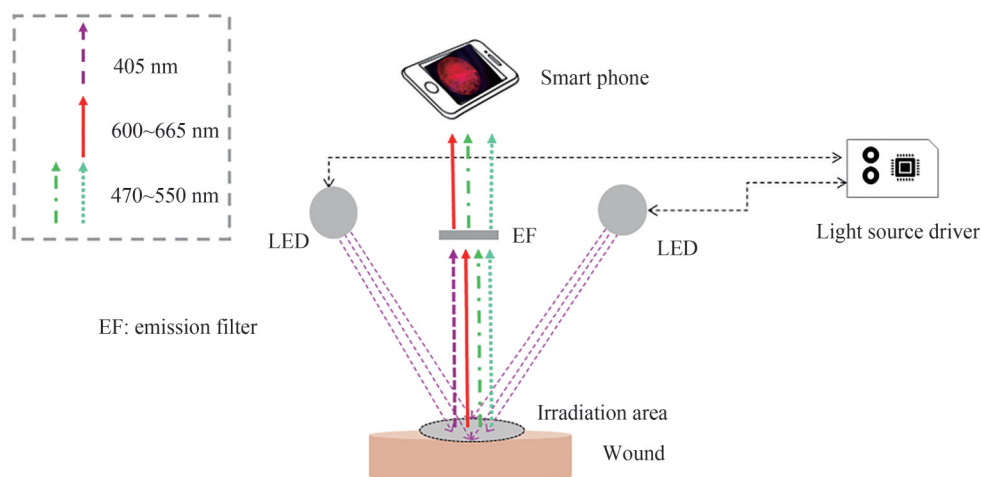


图1 系统示意图

Fig.1 System diagram

使用自行设计的可调恒压恒流模块驱动光源LED,搭配散热模块以保证光源稳定输出。其核心元件主要有降压芯片XL4015以及运算放大器LM358,电路的设计思路是:使用一个二极管连接XL4015的FB引脚和LM358的一个输出端,通过调整LM358的输入端来控制其输出电压,从而控制二极管是否导通,以此实现恒压输出和恒流输出两种功能。此模块采用两层PCB工艺,整个电路由一块降压芯片、一块运算放大

器、若干电阻电容以及两个肖特基二极管(RB751V40T1G)构成,成本低廉且结构紧凑。

根据细菌荧光的最大发射光谱区间特性,定制的双波段滤光片分别保留470~550 nm以及600~665 nm两个波段,以此确保成像设备能够准确接收到细菌荧光信息而且能够滤除光源反射光的干扰。最后使用智能手机采集荧光图像,将样本处于手机正下方8~10 cm处,确保环境足够黑暗,以防止自然光干扰荧光信号。智能手机摄像头最大成像像素为1 200万,设置成像模式为夜间模式,快门速度为3 s,自动白平衡。采集到图像之后,通过数据处理实现细菌高负荷区域的定位以及细菌量化评估。

## 2 数据分析处理方法

### 2.1 系统性能评价参数

信噪比(Signal to Noise Ratio, SNR)是确定单个图像数据质量的一个很好的指标,当信噪比大于16时<sup>[13]</sup>代表图像质量很好。计算信噪比的方法有很多,本次实验中使用信号平均强度与噪声标准差之间的比值作为信噪比的计算结果<sup>[14, 15]</sup>,按照国家计量校准规范、计量检定规程认证的计算信噪比的方法将信号区域像素点信号强度的标准差作为噪声标准差<sup>[16]</sup>,计算表达式分别为

$$I_{\text{mean}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P_i \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (P_i - I_{\text{mean}})^2} \quad (2)$$

$$R_{\text{SN}} = 20 \lg \frac{I_{\text{mean}}}{\sigma} \quad (3)$$

式中, $I_{\text{mean}}$ 为荧光信号区域信号均值, $N$ 为荧光信号像素点个数, $P_i$ 为荧光信号单点像素灰度值, $\sigma$ 为信号区域噪声标准差, $R_{\text{SN}}$ 为信噪比。

最小检测限是根据细菌梯度浓度实验计算得到。本研究设计了细菌梯度浓度实验,并得到线性区域的线性关系,结合平板计数结果,得到相应的细菌浓度-荧光强度关系曲线。然后以4 mL无菌生理盐水作为空白组,得到平均荧光强度,并以此作为系统最小检测限。

### 2.2 感兴趣区域提取与数据处理方法

为了方便向操作者直观地展示细菌荧光区域,使用Microsoft Visual Studio(2019,美国微软公司)+OpenCV库函数提取由智能手机直接拍摄所得图像的荧光信号区域,成功实现了规则和不规则荧光信号区域的提取,所有荧光图像均未进行任何伪彩色处理。如图2,模拟了伤口不规则和规则的细菌区域提取情况。图2(a)中,

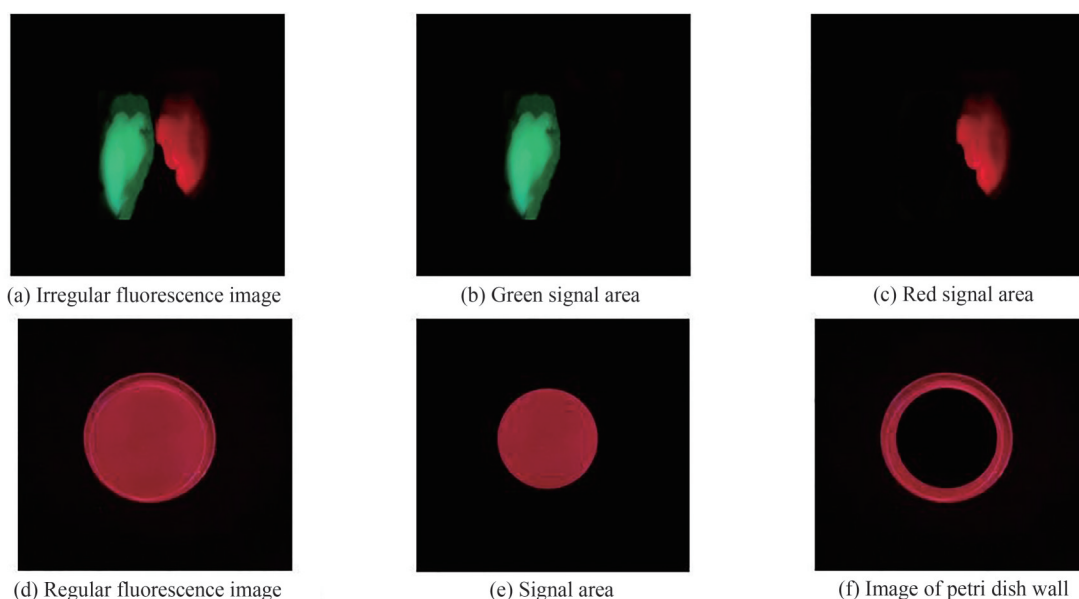


图2 规则和不规则图像处理示意

Fig.2 Schematic of regular and irregular image processing

红色与绿色信号区域均不规则,通过将原图片转换为HSV格式的图像,然后通过调整图像H、S、V三通道的阈值来创建信号掩膜,最后使用掩膜提取出信号区域,结果如图2(b)、2(c)。此外,本研究细菌梯度浓度实验是将细菌盛放在35 mm培养皿内,荧光图像如图2(d)。可以看到培养皿壁在图像上也存在荧光,因此必须要将信号区域与培养皿壁分离。本研究使用OpenCV中的霍夫圆检测方法来检测荧光区域,随后通过调整检测到的圆的半径大小来规避培养皿壁,以此实现信号区域的提取。最后使用OpenCV内的轮廓查找函数和圆绘制函数来找到圆周上的点集并以此来画圆,通过设置参数可直接画出信号区域的掩膜,从而实现信号区域的提取。图2(e)为提取的信号区域,图2(f)为舍弃的培养皿壁。

在提取信号区域的时候统计信号掩膜非零像素点个数作为信号像素点个数,然后遍历信号区域非零像素点的灰度值并进行累加求和,最后计算出信号平均荧光强度。

此外,伤口中的特殊组织,如肌腱和骨骼,在系统光源激发下会发出亮绿色荧光,影响细菌荧光测量。针对有肌腱和骨骼存在的情况,首先拍摄伤口自然光图像,然后再拍摄荧光图像。自然光图像标定肌腱、骨骼等组织,然后根据标定的区域轨迹绘制掩膜图像,通过掩膜图像可以提取出非细菌荧光区域,再使用图像融合方法将此区域从荧光图像上剔除,最后调用信号区域提取算法将细菌荧光信号区域提取出来。

### 3 实验方法与结果分析

#### 3.1 伤口细菌三维荧光光谱检测

为确定最佳的激发和发射波段,采集了五种常见伤口细菌的三维荧光光谱,它们依次分别是:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。在15 mL螺口尖底离心管内加入7 mL LB液体培养基(主要成分为蛋白胨、酵母提取物、NaCl和纯水)和20  $\mu$ L细菌母液,放置于恒温摇床上,设置参数为37  $^{\circ}$ C、220 r/min,培养72 h。三维荧光光谱仪(F-7000,日本日立公司)激发波长设置为220~450 nm,发射波长设置为250~700 nm,激发、发射采样间隔均设置为5 nm,扫描速度为12 000 nm/min,光电倍增管电压为500 V。由于LB在细菌生长过程中被消耗,经多番探究,以稀释100倍的LB作为背景。测得的数据储存在Excel表中,然后将数据规范化至0~255区间,最后使用Origin(2021b,美国OriginLab公司)画出各细菌的三维荧光结果,如图3。图中左下角280 nm处是细菌芳香族氨基酸的荧光峰<sup>[17, 18]</sup>,信号较

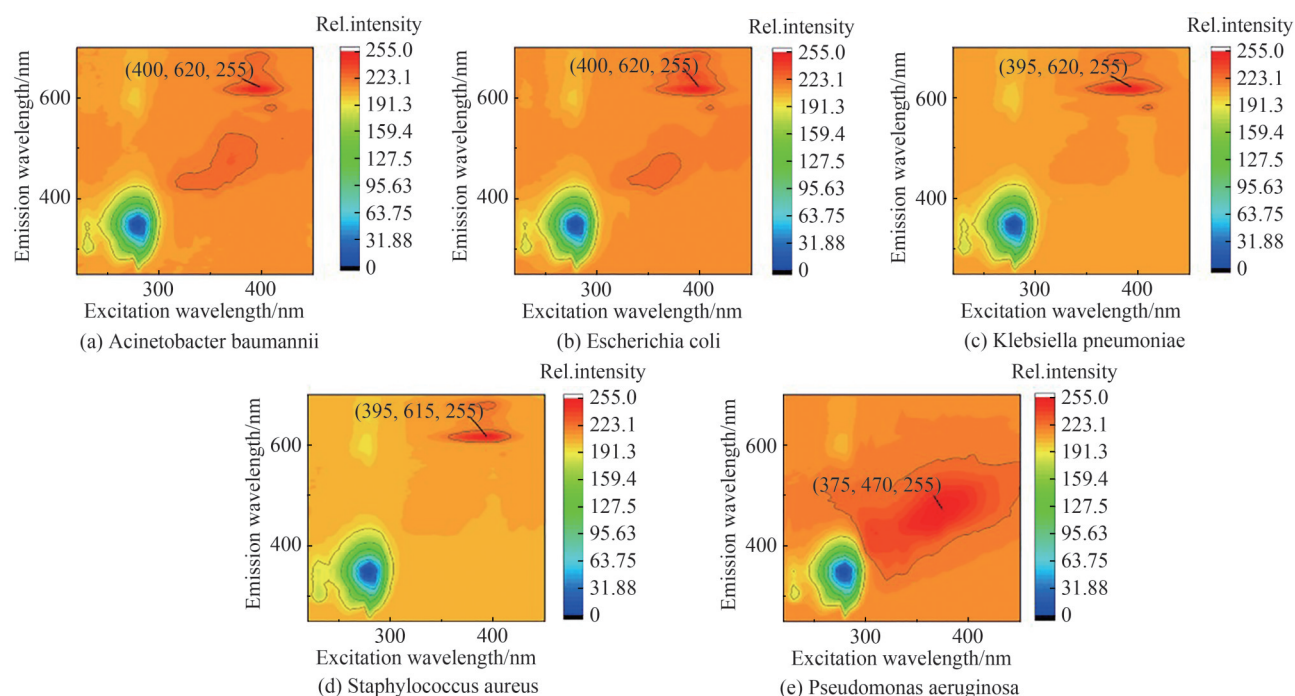


图3 伤口常见细菌三维荧光光谱

Fig.3 Three-dimensional fluorescence spectrum of common bacteria in wound

为微弱。图3(e)标出的是铜绿假单胞菌分泌的铁载体荧光素的荧光峰,呈现亮绿色<sup>[7]</sup>,激发和发射峰分别为375 nm和470 nm;其他几种细菌的荧光峰为细菌中卟啉的荧光峰,呈红色。由图3(a)、3(b)可知,鲍曼不动杆菌和大肠杆菌的最佳激发、发射波长一致,分别为400 nm、620 nm;图3(c)、3(d)展示了肺炎克雷伯氏菌和金黄色葡萄球菌的最佳激发波长,两者同为395 nm,但是最佳发射波长略有区别,分别为620 nm和615 nm。

从实验结果可以看出,所有细菌都存在氨基酸的荧光峰,但是强度很低且不属于可见光波段,因此不在本系统的探测范围之内。在测量条件下,常见细菌的激发峰均在375~400 nm波段,而荧光峰在470 nm和615~620 nm波段,因此,本系统选择的激发光源和探测模块能够实现常见细菌的荧光检测。

### 3.2 成像均匀性分析

光源投射到伤口上激发的荧光,在图像上的均匀性能够很好地反映装置光源角度设置是否合理以及成像镜头的使用是否得当,成像均匀性直接关系到装置的成像质量,本研究通过计算信号区域像素点灰度值的标准差来评估装置成像均匀性。使用卟啉(CAS 553-12-8,阿拉丁试剂(上海)有限公司)(溶解于无水乙醇)作为荧光剂对系统的成像均匀性进行研究,卟啉浓度为200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取10 mL溶液放置于直径为90 mm的培养皿内,在光源激发下拍摄成像,结果如图4。图4(a)为卟啉荧光图像,图4(b)为利用信号区域提取算法提取出的卟啉荧光信号区域。通过计算,信号区域像素点灰度值的标准差为4.40,表明信号区域像素点灰度值的离散程度较小,即装置成像均匀性较好。

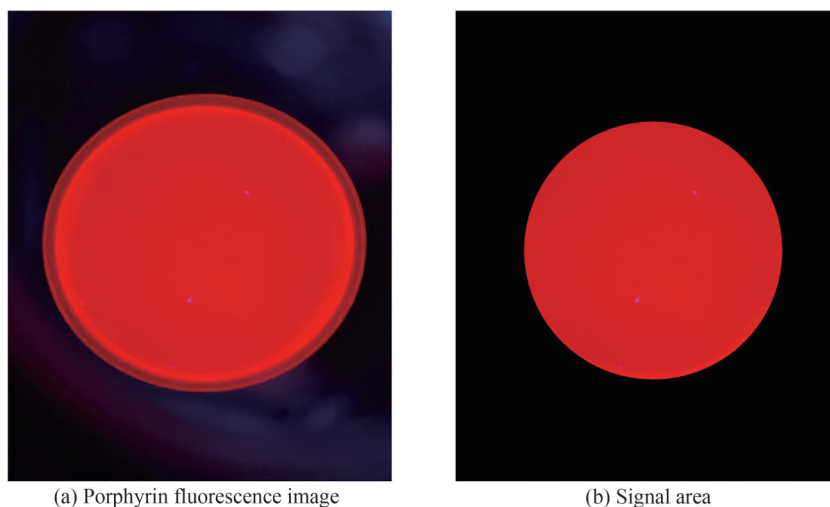


图4 成像均匀性实验  
Fig.4 Imaging uniformity experiment

### 3.3 卟啉的荧光强度与浓度相关性

在进行细菌梯度浓度实验前,先进行卟啉梯度浓度实验,其目的是为了验证在纯卟啉条件下荧光强度与浓度之间的关系,为后面的细菌梯度浓度实验的结果提供参考依据。细菌卟啉荧光一般指的是原卟啉IX (PPIX)的荧光<sup>[9]</sup>,使用PPIX的乙醇溶液作为荧光剂,稀释不同倍数的PPIX溶液可以模拟不同浓度的细菌荧光强度,进而测试系统对不同荧光强度的灵敏度与准确性。

配置初始浓度为200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,随后按照不同稀释倍数配置10个样本,稀释倍数如表1。

取每个稀释倍数的样本4 mL于直径35 mm培养皿内,放置在手机镜头正下方,调整参数使光源驱动器工作在恒流模式,输出电流为400 mA。每个样本成像5次,分别对每个浓度的五个样本取平均值作为当前浓度的相对强度。荧光强度和浓度之间的指数拟合结果如图5(a),平方相关系数为0.993。可以看出,卟啉荧光强度和浓度之间存在线性区间,即本研究中的稀释倍数在500倍及以上,其线性拟合结果如图5(b),线性方程为 $y = -0.03938x + 195.54793$ ,平方相关系数为0.996。

表1 原卟啉IX稀释倍数  
Table 1 Protoporphyrin IX dilution multiples

Sample of porphyrin IX	Dilution multiples
1	10
2	50
3	100
4	300
5	500
6	600
7	800
8	1 000
9	1 200
10	1 500

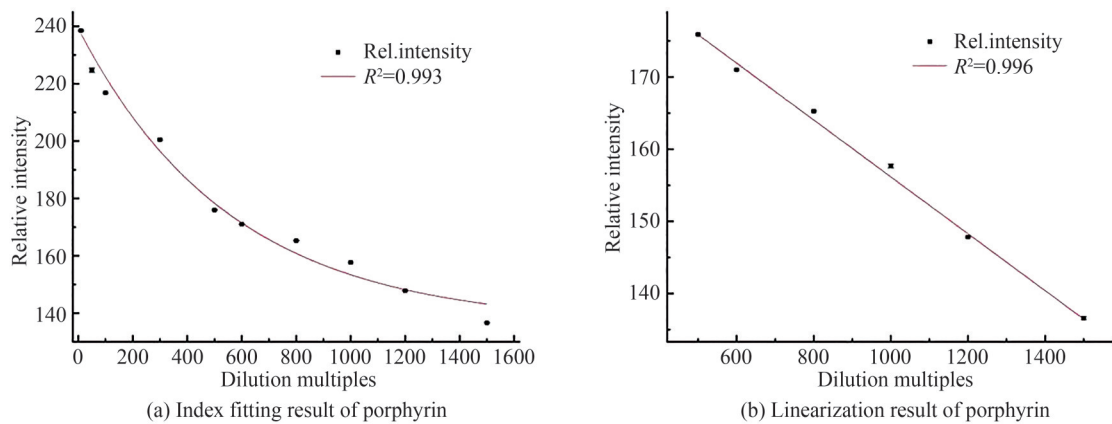


图5 卟啉梯度浓度拟合结果

Fig.5 Fitting results of porphyrin gradient concentration

### 3.4 细菌浓度与荧光强度的关系

为探究细菌荧光强度与浓度之间的关系,在伤口常见细菌中,选取革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌大肠杆菌为代表设计梯度浓度实验。细菌培养条件与三维荧光检测实验相同,培养完毕之后,需要对细菌原液进行离心去除上清液操作。离心条件为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $7\ 000\ \text{r}/\text{min}$ , $4\ \text{min}$ 。去除上清液之后,重新加入无菌生理盐水将细菌再次悬浮以得到去除LB之后的细菌样本溶液。在荧光成像之前,取出 $1\ \text{mL}$ 细菌样本溶液,在原浓度基础上稀释 $10^6$ 倍,然后使用稀释涂布平板法来计数。具体地,取 $50\ \mu\text{L}$ 稀释 $10^6$ 倍的细菌在巧克力培养基(主要成分为蛋白胨、牛肉粉、NaCl、脱纤维羊血、琼脂以及纯水, $405\ \text{nm}$ 光源下无自发荧光)上培养,等到生长出形态圆润,且分布均匀的菌落时统计个数,以此反推细菌原液浓度。

在荧光成像实验中,将光源驱动器调节到恒流模式,以保证光源强度恒定,然后将两种细菌分别稀释 $10$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $250$ 、 $300$ 、 $350$ 、 $400$ 倍。每个浓度细菌样本采集 $5$ 次,对 $5$ 个相对强度取平均值作为当前浓度的平均相对荧光强度。荧光强度与浓度之间的拟合结果如图6。通过平板计数结果,得到金黄色葡萄球菌、大肠杆菌细菌样本溶液浓度分别为 $7.8\times 10^8\ \text{CFU}/\text{mL}$ 和 $8.8\times 10^8\ \text{CFU}/\text{mL}$ 。

图6(a)展示了大肠杆菌的荧光强度与浓度之间的指数拟合结果,平方相关系数为 $0.992$ ;图6(c)展示了金黄色葡萄球菌的荧光强度与浓度之间的指数拟合结果,平方相关系数为 $0.975$ 。从图中可以看出,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的荧光强度和浓度之间存在线性区间,即本研究中的稀释倍数在 $150$ 倍及以上,线性拟合结果如图6(b)、6(d)。图6(b)为大肠杆菌在浓度区间的线性拟合结果,线性关系为 $y = -0.049\ 95x + 59.507\ 24$ ,平方相关系数为 $0.993$ ;图6(d)为金黄色葡萄球菌在不高于 $10^6\ \text{CFU}/\text{mL}$ 量级的浓度区间的线性

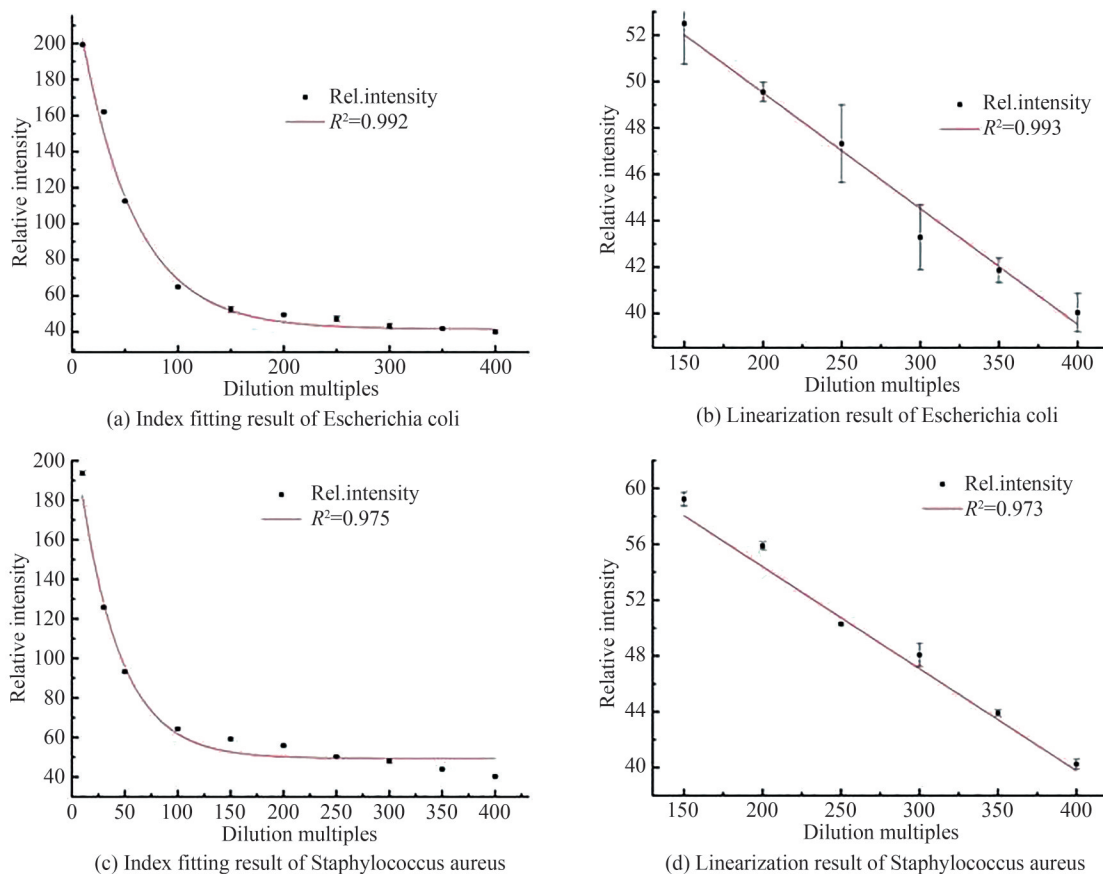


图6 细菌梯度浓度拟合结果  
Fig. 6 Fitting results of bacterial gradient concentration

拟合结果,线性关系为  $y = -0.0731x + 69.01366$ ,平方相关系数为0.973。可以看出,浓度在此区间范围内的细菌荧光强度与浓度之间存在良好的线性关系,因此在此荧光强度下可以简化使用线性拟合获得细菌的量化信息,当荧光强度增大时,可选用指数拟合方式获得细菌量化信息。最后,以4 mL 无菌生理盐水作为空白组,得到空白组平均荧光强度为8.16,再根据荧光强度与细菌浓度拟合曲线计算得到本装置的最小检测限为  $10^5$  CFU/mL 量级。

### 3.5 离体伤口组织细菌识别

为了进一步验证系统对伤口细菌检测的有效性,设计了一种伤口组织模型,该模型主要使用猪皮和皮下脂肪层来模拟人体表皮伤口床。同时,考虑到伤口区域可能存在肌腱、骨骼等荧光干扰组织,在伤口模型上设置了猪踝关节处的肌腱和骨骼组织,被切除表皮而暴露出的脂肪区域模拟人体表皮伤口区域,将培养好的铜绿假单胞菌滴注在此处作为伤口细菌的定植区域。

模型在自然光下的图像如图7(a);打开系统光源,拍摄伤口模型的荧光图像,如图7(b)。从图中可以看到,皮肤组织的荧光强度远低于细菌区域以及肌腱和骨骼的荧光强度。此外,在荧光图像中,肌腱和骨骼的荧光同铜绿假单胞菌荧光均表现为亮绿色。在自然光图像中,能够很轻易识别出肌腱和骨骼所在的位置。因此,通过对比自然光下的图像,可以在荧光图像中对肌腱和骨骼定位,并进行扣除,结果如图7(c);然后再使用信号区域提取算法可以提取出细菌信号区域,结果如图7(d)。实验结果表明,本系统在伤口细菌检测时能够实现细菌荧光信息的提取,即便在有肌腱、骨骼等存在的特殊伤口情况下,也能通过对比正常照明下的图像和荧光图像的方式实现细菌区域的识别,初步证明了系统在细菌伤口检测方面应用的可行性。

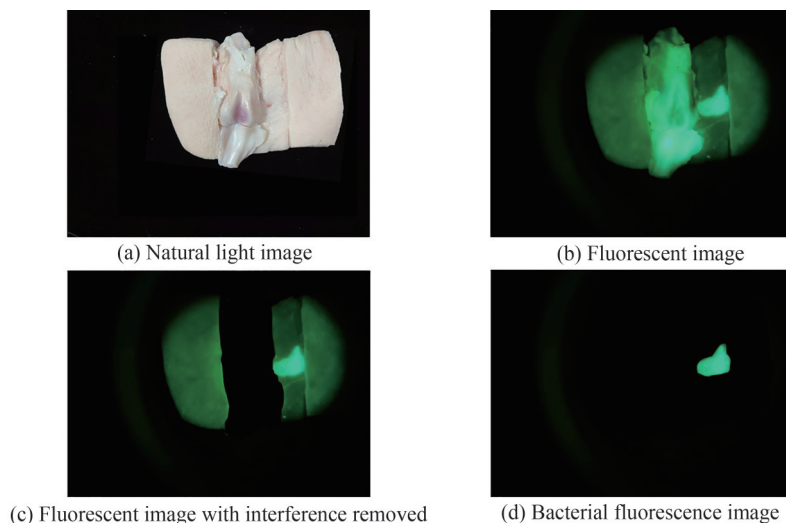


图7 伤口模型自然光和荧光图

Fig. 7 Natural light and fluorescence image of wound model

## 4 结论

基于细菌自发荧光成像,设计了一种细菌快速识别检测系统。系统只需一部智能手机,搭配一片双波段滤光片以及LED光源模块即可,光源驱动模块小巧且易于封装,系统简单高效。此外,在梯度浓度实验中,任何浓度下的荧光图像信噪比均大于等于20,成像均匀性好。系统检测灵敏度高,能够满足感染伤口细菌载量的识别,响应速度快,在30 s内实现伤口细菌的体外测量。利用本装置检测细菌无需进行拭子采样和荧光标记,通过荧光信号区域提取和计算可以直接得出细菌荧光区域和相对强度。下一步将开展在体伤口细菌实验,进一步验证装置的可行性;同时,进一步优化集成现有的处理算法,提升系统性能。未来的目标是使用该装置实现细菌高负荷区域的检测功能,同时能够对伤口细菌载量做出评估,辅助临床工作者判断伤口感染情况。

### 参考文献

- [1] OTTOLINO-PERRY K, CHAMMA E, BLACKMORE K M, et al. Improved detection of clinically relevant wound bacteria using autofluorescence image-guided sampling in diabetic foot ulcers [J]. *International Wound Journal*, 2017, 14(5): 833-841.
- [2] WOJNO K J, BAUNOCH D, LUKE N, et al. Multiplex PCR based Urinary Tract Infection (UTI) analysis compared to traditional urine culture in identifying significant pathogens in symptomatic patients [J]. *Urology*, 2020, 136: 119-126.
- [3] FANG Y L, WANG C H, CHEN Y S, et al. An integrated microfluidic system for early detection of sepsis-inducing bacteria [J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(1): 113-121.
- [4] LIU Yu, LI Zengwei, DENG Zhipeng, et al. Rapid detection of food borne pathogens by laser-induced fluorescence spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2021, 41(9): 2817-2822.  
刘宇, 李增威, 邓志鹏, 等. 激光诱导荧光光谱快速检测食源性致病菌[J]. *光谱学与光谱分析*, 2021, 41(9): 2817-2822.
- [5] BHATTA H, GOLDYS E M, LEARMONTH R P. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(1): 121-126.
- [6] WU Y C, KULBATSKI I, MEDEIROS P J, et al. Autofluorescence imaging device for real-time detection and tracking of pathogenic bacteria in a mouse skin wound model: preclinical feasibility studies [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(8): 085002.
- [7] JEFFERY S, DAI T, WU M X, et al. The utility of MolecuLight bacterial sensing in the management of burns and traumatic wounds [C]. *Photonic Diagnosis and Treatment of Infections and Inflammatory Diseases II*, 2019, 10863: 1086304.
- [8] JONES L M, DUNHAM D, RENNIE M Y, et al. In vitro detection of porphyrin-producing wound bacteria with real-time fluorescence imaging [J]. *Future Microbiology*, 2020, 15: 319-332.
- [9] DIETEL W, POTTIER R, PFISTER W, et al. 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: a study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2007, 86(1): 77-86.



- [10] ZENG Lin, LU Yanyi, LI Min, et al. Detection of wound bacterial infection in rats by high field asymmetric waveform ion mobility spectroscopy [J]. *Journal of Traumatic Surgery*, 2020, 22(12): 956-958.  
曾琳, 陆彦邑, 黎敏, 等. 高场非对称波形离子迁移谱检测大鼠伤口细菌感染[J]. *创伤外科杂志*, 2020, 22(12): 956-958.
- [11] ZHENG Yuhao, CHEN Wenjing, LV Lizhen. Analysis of common bacterial infection and drug resistance of wound secretion in 996 cases [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 32(17): 1990-1992.  
郑宇浩, 陈文静, 吕丽珍. 996例伤口分泌物常见细菌感染及其耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(17): 1990-1992.
- [12] GIOUX S, CHOI H S, FRANGIONI J V. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation [J]. *Molecular Imaging*, 2010, 9(5):237-255.
- [13] YANG Jun, WANG Cheng, WANG Yunfeng. An image quality SNR evaluation method based on HVS model [J]. *Journal of Hebei University of Science and Technology*, 2002, 23(4): 80-85.  
杨军, 王成, 王云峰. 一种基于HVS模型的图像质量信噪比评价方法[J]. *河北科技大学学报*, 2002, 23(4):80-85.
- [14] SHI W, GAO W, CHEN C, et al. Differential standard deviation of log-scale intensity based optical coherence tomography angiography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(12): 1597-1606.
- [15] XIE Chenxia, GAO Wanrong, ZHANG Yue. Image speckle noise suppression method based on OCT imaging signal amplitude difference probability density distribution [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(12): 1207004.  
谢晨霞, 高万荣, 张越. 基于OCT成像信号振幅差分概率密度分布的图像散斑噪声抑制方法[J]. *中国激光*, 2020, 47(12): 1207004.
- [16] XU Wenhui, LIN Xiaoling, LI Ke. Research on Signal-to-Noise Ratio (SNR) detection method of quality control image in medical magnetic resonance imaging system [J]. *China Medical Equipment*, 2022, 19(3): 28-33.  
许文辉, 林晓玲, 李可. 医用磁共振成像系统质量控制图像信噪比检测方法的研究[J]. *中国医学装备*, 2022, 19(3): 28-33.
- [17] DU R, YANG D, YIN X. Rapid detection of three common bacteria based on fluorescence spectroscopy [J]. *Sensors (Basel)*, 2022, 22(3):1168.
- [18] RANAWAT H, MAZUMDER N, MURALI T S, et al. Deciphering biophysical signatures for microbiological applications [J]. *Lasers in Medical Science*, 2020, 35(7): 1493-1501.

## Research and Design of Bacterial Autofluorescence Detection Device

ZHENG Jiayun<sup>1,2</sup>, WANG Yikun<sup>2,3</sup>, NI Jingshu<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>2</sup>, HUANG Yao<sup>2,3</sup>,  
ZHANG Yuanzhi<sup>2,3</sup>, WANG Quanfu<sup>2</sup>, WANG Xia<sup>2</sup>, LUI Yong<sup>2,3</sup>, ZHOU Jinhua<sup>1</sup>, DONG Meili<sup>2</sup>

(1 School of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

(2 Anhui Provincial Engineering Laboratory for Medical Optical Diagnosis & Treatment Technology and Instrument, Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Biomedical Optical Instrument, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

(3 Wanjiang Center for Development of Emerging Industry Technology, Tongling 244000, China)

**Abstract:** Excessive bacterial load will not only cause delayed wound healing and local or systemic inflammatory reaction, but also threaten the life safety of patients in severe cases. Therefore, a new method that can detect wound bacteria quickly and directly is needed. Traditional bacterial detection methods are mainly visual observation of clinical symptoms (including fever, redness and swelling, pus exudate, etc.) and microbial swab sampling, but these two methods are usually subjective and time-consuming. The results of the same clinical symptom observed by doctors with different experiences may be different, and in some cases the infection may not show obvious symptoms. Therefore, it is often subjective to judge the infection by observing the clinical symptoms with naked eyes and may cause misdiagnosis. Swab sampling is often plagued by false negative, and different sampling methods and selection of sampling areas will affect the results of sampling and culture. False negative areas or missed areas may contain a large number of bacteria. The missing of a large number of bacteria in these areas may lead to repeated wound healing, causing great pain to patients and great burden on the medical and health system. In addition, longer culture time is also a pain point for swab sampling, because it may cause

inaccurate culture results and miss the best treatment opportunity. Relevant studies have found that bacteria can emit fluorescence by themselves under the excitation of 405 nm light source, without using contrast agents. The purpose of this study is to design a fluorescence detection imaging device based on the principle of spontaneous fluorescence of bacteria, which provides a fast and direct new method for wound bacteria detection. In this study, a bacterial fluorescence imaging system is developed. The light source module of the system consists of two LED with a central wavelength of 405 nm and LED driver modules. After calibration and parameter setting, the light source driver works in constant current mode to ensure stable operation of the light source. When the light source shines on the wound bacteria, it can stimulate the spontaneous fluorescence of bacteria almost in a moment. The customized dual band filter is used to receive bacterial fluorescence and filter out the interference of reflected light from the light source. The transmission band of the filter is selected according to the results of the three-dimensional fluorescence spectrum of bacteria. In the dark environment, the smartphone imaging mode is set to night mode, the shutter speed is set to 3 s, the automatic white balance is set, and each sample is collected five times to reduce experimental error. Porphyrin fluorescence images are converted into three-dimensional intensity images to verify the imaging uniformity of the device. The fluorescence region is detected by region extraction algorithm, and the bacterial fluorescence is quantified. The signal area is extracted by using the Hough circle detection and edge contour extraction method as well as the mask method obtained by using the binary function. The gray value of all pixels in the signal area is traversed and the average value is calculated, which is taken as the quantitative result of the relative fluorescence intensity of bacteria. Finally, a linear rule between the fluorescence intensity and the concentration is obtained by linear fitting of the quantitative result. The experimental results of three-dimensional fluorescence spectrum of bacteria provide an important basis for the selection of excitation and emission bands in this study. It can be seen from the porphyrin three-dimensional intensity map that, except for the projection points of the two light sources, the uniformity of the signal area is good. This indicates that the two LED light sources used in the device can uniformly excite the fluorescent signal area, and the fluorescent image with good quality can be obtained without using the whole row of ring LEDs as light, which greatly reduces the power consumption and heat generation of the system. The result of image processing proves that regular and irregular signal regions can be extracted with the device. The regular region extraction algorithm can accurately extract the fluorescent signal region, avoid the fluorescent interference of the culture dish wall, and effectively improve the calculation accuracy of the relative signal strength. The gradient concentration of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* shows that there is a good linear relationship between the bacterial fluorescence intensity and the bacterial quantity under the experimental bacterial concentration. Combined with the bacterial plate counting experiment, the minimum detection limit of the system is  $10^5$  CFU/mL, which indicates that the system can effectively detect the infection of wounds. Through linear fitting of the calculation results, it can be obtained that there is a linear relationship between bacterial fluorescence intensity and concentration, and the minimum detection limit of the system can be calculated according to the linear relationship. The device provides a new means for the bacterial detection of the wound, with high detection sensitivity to meet the bacterial load identification of the infected wound. There is no need for swab sampling and fluorescent labeling, and the detection procedure is simple and easy to operate. The extraction of signal region can clearly and intuitively show the location of bacteria, which can provide effective reference information for wound debridement and targeted drug administration. This study only conducts quantitative detection of bacteria in vitro, and further measurement of bacteria in vivo is needed. In addition, future efforts should include the development of a smartphone app that integrates existing processing algorithms to further simplify the process and enable rapid in vivo detection of wound bacteria.

**Key words:** Bacterial autofluorescence imaging; Bacteria detection; Infection; Image processing; Bacterial quantization

**OCIS Codes:** 170.3880; 170.3890; 170.4580; 170.6280; 170.6930