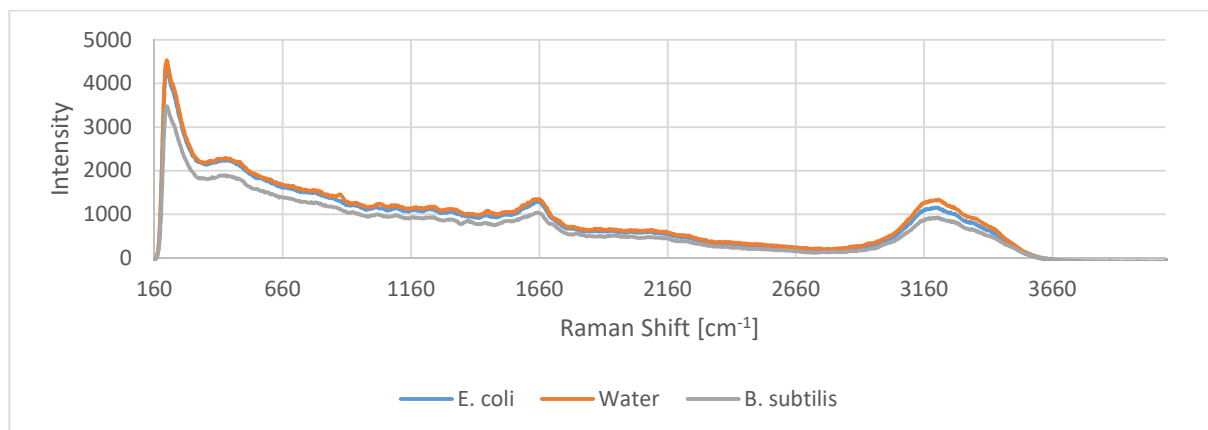


תוצאות ראשוניות

ניסוי ראמאן

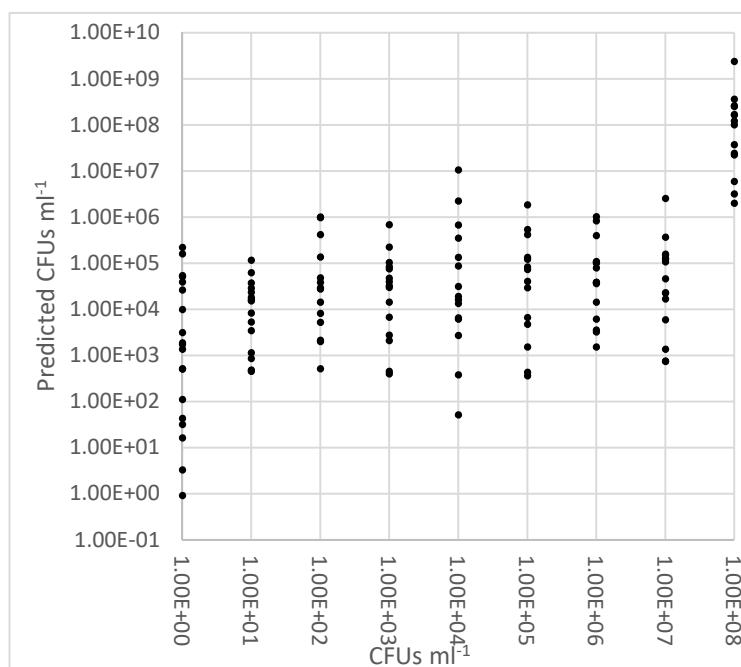
בניסוי הראמאן ניסינו להבחין בחיידקי *E. coli* ו-*B. subtilis* בריכוזים שונים. לשם כך בחנו את ספקטרום הראמאן של החיידקים בעירור ע"י לייזר באורך גל 785nm. דוגמה של הספקטרה מופיעה באיור 5.



איור 5. ספקטרום התמרת ראמאן של דוגמאות של חיידקי *E. coli*, *B. subtilis* בריכוז 10^8 ו- 10^7 CFUs ml⁻¹ בהתאמה בתרחיף מים מזוקקים, ודוגמה של מים מזוקקים ללא חיידקים. הדוגמאות נסרקו בזמן חשיפה של 5 שניות ללייזר בעוצמה 175mW בכוסית אלומיניום.

נמצא שבעין לא ניתן להבחין בין הספקטרה ולכן נבחנה האפשרות למצוא את ריכוזי החיידקים באמצעות מודל מתמטי מבוסס PLS. ניתוח ראשוני עם המודל הציג זיהוי ריכוז החיידקים בדיוק של פחות מ-50% (איור 6).

CFUs ml ⁻¹	n	Hits	Hit%
0.00E+00	4	0	0%
1.00E+00	4	1	25%
1.00E+01	4	1	25%
1.00E+02	2	1	50%
1.00E+03	4	3	75%
1.00E+04	3	2	67%
1.00E+05	3	1	33%
1.00E+06	3	0	0%
1.00E+07	5	0	0%
1.00E+08	5	0	0%
Totals	30	9	30%



איור 6. מודל PLS ראשוני לזיהוי חיידקים במיהולים עשרוניים בספקטרוסקופיית ראמאן. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. בטבלה ניתן לראות את תוצאות הצלחת המודל מול סט נתונים שלא הוכלל בהכנת המודל (Validation Set). מספר הדוגמאות הכוללות בהכנת המודל היה 150. המודל כולל תהליך של Centering ו-Scaling.

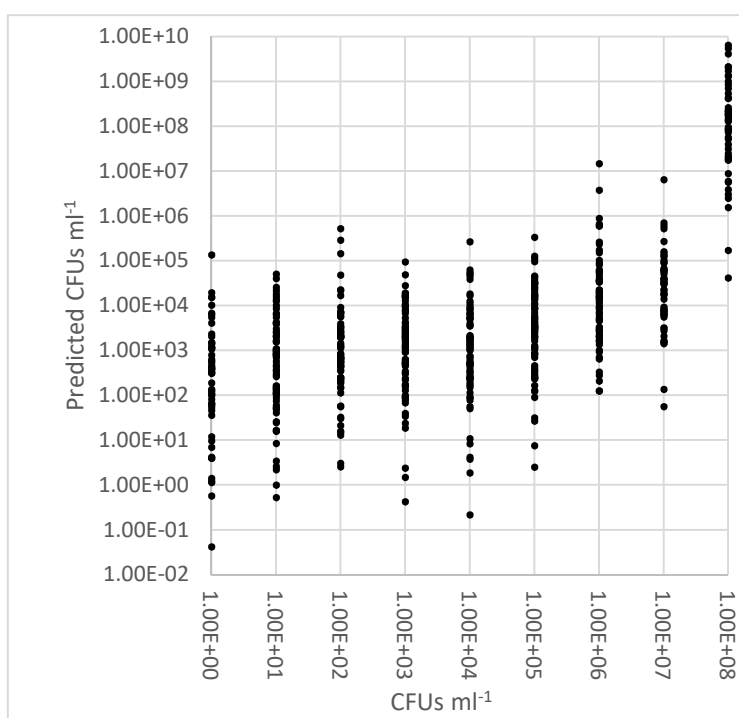
במהלך שנת המחקר הראשונה בוצעו ניסויים על מנת לשפר את יכולת הזיהוי של המכשיר. הניסויים כללו שינויים בתהליך סריקת החיידקים, הן במישור הכנת הדוגמה והן במישור תהליך הסריקה ותכנון מכשיר הסריקה על מנת להגיע לרגישות גבוהה יותר של הבדיקה. עד היום המאמצים לא עלו יפה.

כחלק מעבודה זו נבחנו השפעות: זמן הקרנת החיידקים בלייזר בטווח שבין 0.5 שניות ל-300 שניות, פירוק החיידקים באמצעים כימיים על ידי שטיפת החיידקים באתנול והרחפתם במים, ובאמצעים פיזיקליים באמצעות הרתחה של מספר דקות, הפעלת עקת קור (על ידי ביצוע כל תהליך הכנת הדוגמה ב-4 מע"צ). אשר אמורה לגרום לייצור מוגבר של חומרים בעלי התמרת ראמאן (בהתאם לעבודה של Premasiri ושותפיו [20]), עוצמת הלייזר (בטווח שבין 70mW ל-525mW), ייבוש החיידקים על גבי משטח זכוכית ואלומיניום וסריקת החיידקים על רקע של סליין (0.9% NaCl). יתרה מזאת, בוצעו ניסויים ראשוניים של סריקת חיידקים שיובשו על גבי משטחי SERS מבוססי חלקיקי כסף. ניסיונות אלה לא הראו שיפור ברגישות המכשיר.

גישה נוספת שנבדקה היא השפעות של מניפולציות מתמטיות / סטטיסטיות כגון: התמקדות באזורי התמרה מסוימים, נרמול הנתונים במספר גישות, מודלים סטטיסטיים מבוססי PLS הכוללים "עיבוד מקדים" (Centering, Scaling, Exclusions).

המודל המוצלח ביותר שהתקבל עד כה בעל סף רגישות לחיידקי *E. coli* בריכוז 10^8 CFUs ml^{-1} ברמת דיוק של 86% (איור 7) אך ללא יכולת זיהוי מתחת לריכוז זה.

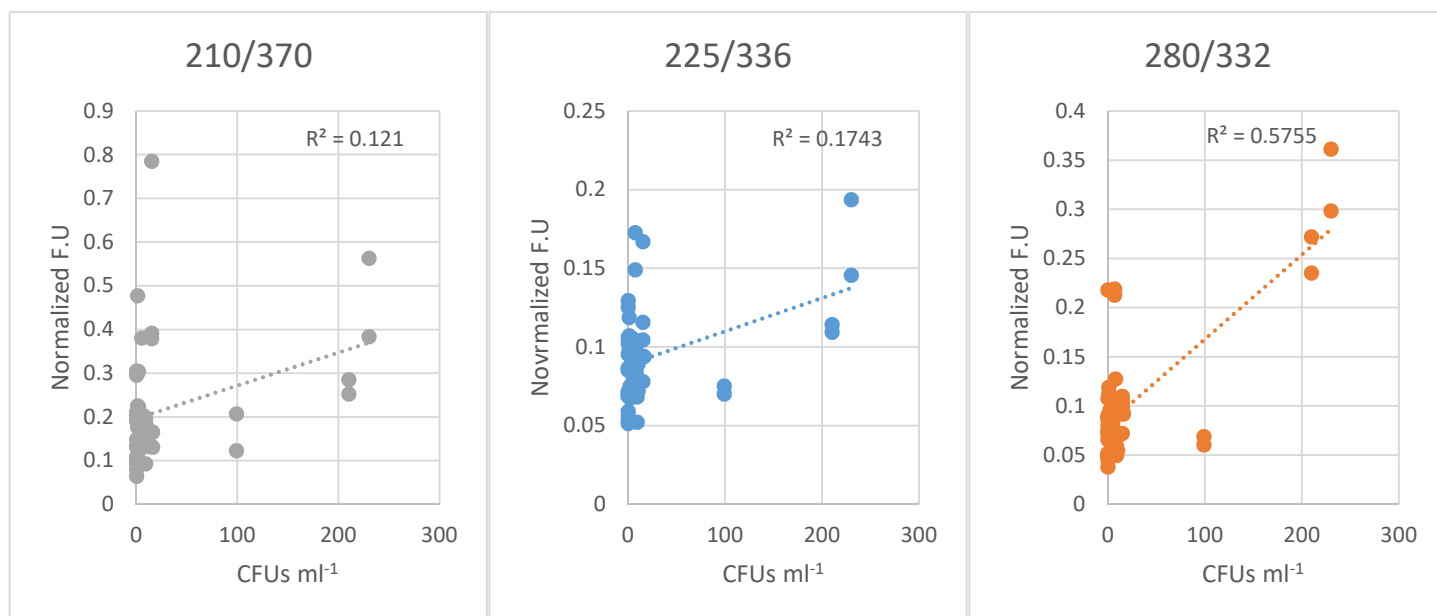
CFUs ml^{-1}	n	Hits	Hit%
0E+00	11	3	27%
1E+00	5	0	0%
1E+01	14	2	14%
1E+02	18	8	44%
1E+03	20	10	50%
1E+04	17	10	59%
1E+05	15	3	20%
1E+06	15	1	7%
1E+07	11	0	0%
1E+08	7	6	86%
Total	133	43	32%



איור 7. מודל PLS לזיהוי חיידקים בספקטרוסקופיית ראמאן. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. בטבלה ניתן לראות את תוצאות הצלחת המודל מול סט נתונים שלא הוכלל בהכנת המודל (Validation Set). מספר הדוגמאות הכוללות בהכנת המודל היה 659, לאחר הסרת 7 דוגמאות חריגות. המודל כולל תהליך של Scaling, Centering ונרמול לערך מקסימום בהתמרת ראמאן באורך גל 208.8 cm^{-1} .

ניסוי פלורסנציה

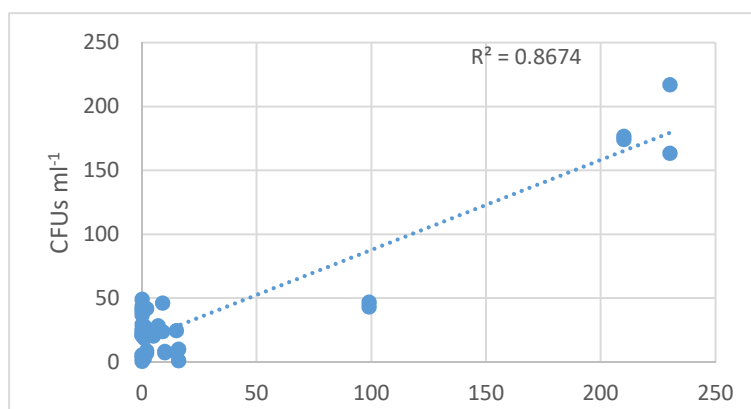
החל מחודש אוגוסט אנו בודקים את ה-EEM בדגימות מים. בעקבות עבודות קודמות התמקדנו בעיקר בניתוח הנתונים באורכי הגל עירור 210/370, 225/336 ו-280/332. לא נמצאה התאמה בין עוצמת הפליטה באורכי הגל הנ"ל לכמות החיידקים ולכן נראה שלא ניתן לכמת את החיידקים בדוגמה באורך גל עירור/פליטה יחיד (איור 8).



איור 8. התאמה בין עוצמת עירור באורכי גל עירור/פליטה שונים לריכוז חיידקים כפי שנמדד בשיטות סטנדרטיות. עוצמת העירור מנורמלת לערכי עירור ראמאן באורך גל עירור/פליטה 275/305. $n=49$.

היות שנראתה אפשרות ששילוב של מספר משתנים עלול להוביל ליכולת כימות חיידקים טובה יותר, נבחנו הנתונים באמצעות מודל מבוסס PLS. באמצעות מודל ה-PLS הצלחנו לראות חלוקה איכותית לקבוצות "מעל 100 CFUs ml⁻¹" ו-"מתחת ל-100 CFUs ml⁻¹" ולמצוא התאמה בין "הערכת המודל" לכמות החיידקים ($R^2 = 0.867$) (איור 9).

CFUs ml ⁻¹	n	Hits	Hit%
Over 100	2	2	100%
Under 100	7	7	100%
Totals	9	9	100%



איור 9. מודל PLS לזיהוי חיידקים בפלורסנציה. בגרף ניתן לראות את הערכים החזויים ע"י המודל לעומת הערכים האמיתיים. בטבלה ניתן לראות את תוצאות הצלחת המודל מול סט נתונים שלא הוכלל בהכנת המודל (Validation Set). מספר הדוגמאות הכוללות בהכנת המודל היה 40. המודל כולל תהליך של Scaling, Centering ונרמול עוצמת העירור לערכי עירור ראמאן באורך גל עירור/פליטה 275/305.

יש לציין כי הנתונים מגיעים מדוגמאות סביבתיות בהן ריכוז החיידקים נמוך ונראה שרבות מהדוגמאות נמצאות מתחת לסף הרגישות. במהלך העבודה נמצא שיש לנרמל את ערכי הפלורסנציה לערכי פלורסנציה קבועים של פליטת ראמאן בעירור 275nm ופליטה ב-305nm מאחר שישנה וריאציה בעוצמה האבסולוטית בין ימי הבדיקה. בנוסף, מניפולציה מתמטית של Centering, Scaling, ושימוש בערכים מוחלטים (Absolute values) שיפרה את המודל.

כאשר המודל נבחן (Validation) על ידי דוגמאות שלא שימשו בהכנת המודל, הצלחנו למצוא התאמה של 100% (9/9) ל-2 הקבוצות. אנליזה זו מראה כי קיים פוטנציאל לזיהוי חיידקים בריכוזים של 10^2 CFUs ml⁻¹ באמצעות ספקטרוסקופיית פלורסנציה.¹