

Abschlussbericht (Sachbericht II)

zum Teilvorhaben:

**Erforschung eines Mess-Systems zur spektroskopischen Diagnostik
mikrobieller Blutproben**

im Verbundprojekt:

**Spektroskopische Plattform zur Diagnostik von Infektionen aus Blut
(InfectoXplore)**

Zuwendungsempfänger: Mibic GmbH & Co. KG

Förderkennzeichen: 13GW0459C

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2020 bis 31.08.2025

DOI: <https://doi.org/10.34657/30350>

Inhaltsverzeichnis

1	Projektziel und Strategische Ausrichtung.....	3
1.1	Aufgabenstellung.....	3
1.2	Voraussetzungen zur Durchführung des Projektes	3
1.3	Planung und Ablauf des Projektes.....	3
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand	3
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	4
1.6	Bearbeitete Arbeitspakete	4
2	Detaillierte Beschreibung der Ergebnisse	5
2.1	Lastenheft	5
2.2	Gerätekonzzept: Inverses Mikroskop	6
2.3	Probenanforderungen	7
2.4	Technische Umsetzung und Komponentenwahl	7
2.4.1	Auswahl der Laserquelle	7
2.5	Aufbau eines Demonstrators	8
2.5.1	Thermische Stabilität und Drift-Tests.....	9
2.6	Spektrometer-Design	11
2.7	Software und Automatisierung	13
2.8	Finale Objektiv-Auswahl und Laseranpassung.....	16
2.8.1	Umbau der roten Laseranregung zu höheren Leistungen	17
3	Fazit und Projekterfolg	18

1 Projektziel und Strategische Ausrichtung

Das primäre Ziel des Projekts war die Realisierung eines robusten, wartungsarmen Geräts zur schnellen Analyse von Bakterien, mit besonderem Fokus auf die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) von Antibiotika.

1.1 Aufgabenstellung

Ziel unseres Teilvorhabens war die Erforschung Es soll ein kompaktes, preisgünstiges, bedienarmes und robustes Gerätesystem für die optisch-spektroskopische mikrobielle Erregerdiagnostik und Resistenzbestimmung aus frühen positiven Blutkulturen erforscht und verwirklicht werden. Die Kombination dieser Merkmale hat Alleinstellungscharakter. Im Ergebnis des Verbundvorhabens wird damit eine spektroskopische Diagnostik-Plattform zur schnellen Identifikation bakterieller Erreger und ihres Resistogramms realisiert, wodurch die gezielte Behandlung betroffener Patienten mit entsprechenden Antibiotika deutlich beschleunigt wird. Damit wird das Verfahren die medizinische Diagnose von Infektionen und Sepsis revolutionieren.

1.2 Voraussetzungen zur Durchführung des Projektes

Die Mibic GmbH & Co. KG ist ein junges Unternehmen mit aktuell acht Mitarbeitern auf dem Gebiet der Erforschung und Entwicklung von Analysesystemen zur schnellen präzisen Analyse mikrobieller Kontaminationen mittels schwingungs-spektroskopischer Methoden. Der Nachweis einzelner Mikroorganismen wird mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie realisiert. Drei der derzeit sieben Mitarbeiter (zwei promovierte Chemiker, ein promovierter Physiker) haben langjährige Erfahrung als Messgeräteentwickler davon zwei als Geschäftsführer. Dies stellte die nötige wissenschaftliche, technische und betriebswirtschaftliche Kompetenz zur Durchführung des Teilvorhabens sicher. Mibic besitzt ein eigenes Mikrobiologie- und Raman-Labor und konnte wichtige Schlüssel-Messungen und -Arbeiten selbst durchführen.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das Teilprojekt konnte im Wesentlichen wie geplant durchgeführt werden. Das Gerätesystem konnte fertiggestellt, optimiert und schließlich in der Universitätsklinik Jena an realen Proben getestet werden. Die Zusammenarbeit unter den beteiligten Organisationen war sehr gut. Insbesondere die Kooperation mit dem Mitarbeitern des IPHT hat die Optimierung des Systems effizient ermöglicht.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Bearbeitung des Teilprojektes konnte an den im Absatz Voraussetzungen zur Durchführung des Projektes geschilderten Wissensstand direkt anknüpfen. Die Zusammenarbeit unter den beteiligten Organisationen war sehr gut. Insbesondere die Kooperation mit dem Mitarbeitern des IPHT hat die Optimierung des System effizient ermöglicht. Insbesondere die

Erfahrungen im Bereich der Bilderkennung und der spektroskopischen Datenanalyse ermöglichten die Umsetzung des Projektes in dem geschilderten Rahmen.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben dem von der Projektkoordinatorin organisierten Informationsaustausch mit den am Gesamtverbund beteiligten Forschergruppen wurde ein besonders intensiver Austausch mit dem IPHT in Jena und der medizinischen Mikrobiologie in Jena gepflegt.

1.6 Bearbeitete Arbeitspakete

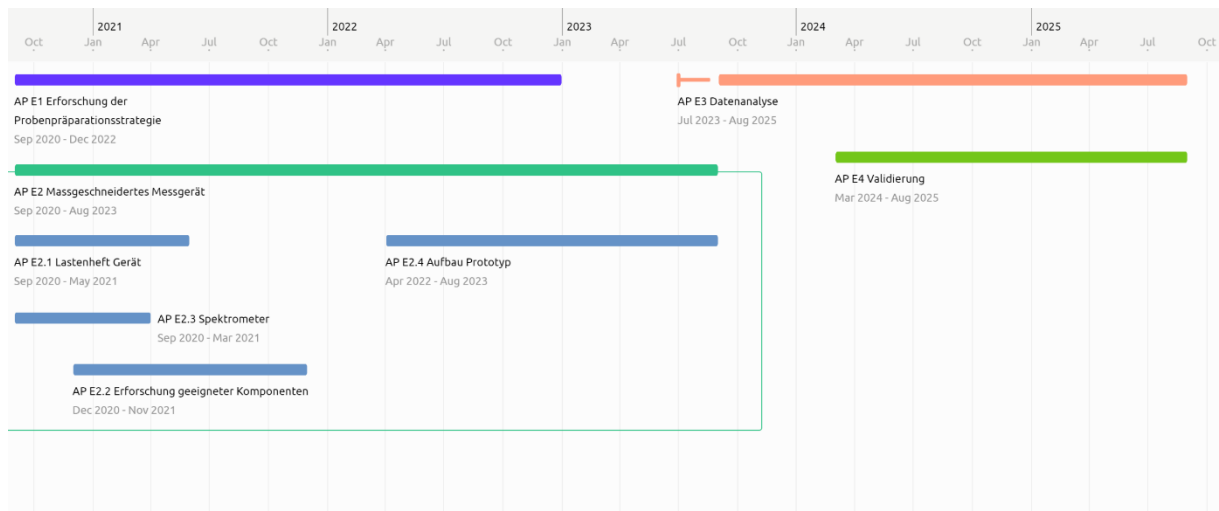


Abbildung 1: geplante Arbeitsplanung im Projekt. Alle Arbeitspakete konnten bearbeitet werden

Probenpräparationsstrategie AP1

Die Einbindung in die Probenpräparationsstrategie konnte durch die Anforderungsdefinitionen Probleme bei der Probenaufarbeitung reduzieren, wie die strikte Vermeidung fluoreszierender Chemikalien oder Erforschung entsprechender Alternativen und so die späteren reibungslosen Messablauf gewährleisten

Anforderungsanalyse und Strategie AP2.1

Zu Projektbeginn wurden die Anforderungen an das Gerät und die Strategie und in einem Lastenheft definiert:

Gerätekonzep: Es wurde ein inverses Mikroskop gewählt. Dies ermöglichte kürzere optische Pfade und eine stabilere Montage schwerer Komponenten auf der optischen Bank statt an einem Turm, was „zitterfreie“ Bilder und Spektren begünstigt.

Technische Umsetzung und Komponentenwahl Ap2.2

In dieser Phase lag der Fokus auf der Auswahl und dem Test der zentralen Hardware-Komponenten:

Die Wahl bei Laser und Wellenlänge fiel auf den roten Spektralbereich 633 nm, um ein Optimum zwischen Raman-Signalstärke (besser bei kurzen Wellenlängen) und geringer Fluoreszenz-anregung zu erreichen.

Spektrometer A.P. 2.3

Es wurde ein Gitterspektrometer in der Fastie-Ebert-Konfiguration gewählt.

Aufbau des Demonstrator AP 2.4

Ein vollautomatisches Ramansystem zur Messung der Mikroorganismenwolken im Chip der Projektpartner wurde erstellt. Hierzu wurde sowohl die Optik als auch die Software von Grund auf entwickelt

Datenanalyse AP 3.1

Spektrenvorbehandlung Es wurden Algorithmen zur automatischen Kalibrierung, Dunkelsignalaufnahme- und korrektur, Spikeentfernung und Binning implementiert und getestet.

Datenstruktur AP3.2

Der Messablauf wurde an die Auswertestruktur der MIC Bestimmung angepasst: freie Definition der Messkoordinaten, Anpassung der Messzyklen um die benötigten Reaktionszeiten zu ermöglichen

Optimierung Ap 4.1

In der finalen Phase wurden Software und Feinmechanik verbessert und das System in realen Messkampagnen getestet.

Validierung AP. 4.2

Im Mai 2025 konnte das Messgerät in die Uniklinik Jen überführt werden. Das Projekt schloss mit einer erfolgreichen Messkampagne im Juli/Augst 2025. ab.

- **Zielerreichung:** Es konnte eine komplette **MIC-Bestimmung** (Minimale Hemmkonzentration) durchgeführt werden mit einer erheblichen höheren Geschwindigkeit

2 Detaillierte Beschreibung der Ergebnisse

2.1 Lastenheft

Die grundlegenden Anforderungen des zu erstellenden Messdemonstrator wurden in Absprache mit den Partnern in einem Lastenheft festgelegt:

Wesentlich Punkte des Lastenhefts sind in Tabelle 1 dargestellt

Tabelle 1: Tabellarisches Lastenheft für den zu erforschenden Chipreader

Bereich	Anforderung
---------	-------------

Optik	<ul style="list-style-type: none"> • Möglichkeit zur Durchlicht- und Auflicht-Detektion zwingend • Möglichkeit zur zusätzlichen Dunkelfeld-Option sollte vorhanden sein • Fluoreszenz-Detektion sollte vorhanden sein, Wellenlänge abhängig vom und damit der Detektionsstrategie (Sensitivität, Spezifität, Robustheit, • Beleuchtung mit hohem Licht-Durchsatz und für 3D-Geometrie einer Probe (Chip) soll möglich sein • Mikroskop-Objektiv: für maximale Lichtausbeute NA 0,95 (und dadurch Arbeitsabstand WD ca. 1 mm) erforderlich • Schneller und robuster konfokaler Laser-Autofokus (entscheidend für Schnelligkeit des Gesamtsystems, geforderte Auflösung 100 nm oder besser, in weniger als 250 ms) • Routine zur spektralen Auto-Kalibration muß verpflichtend; bildet Grundlage für Inter-Geräte-Übertragbarkeit von Spektren; Kalibrations-Aufgaben: spektrale Laserposition, peakreiches Spektrum von Acetaminophenol, Abgleich der Geräte-Übertragungsfunktion mittels Spektrum einer Weißlichtquelle oder eines Fluoreszenz-Standards vom NIST) • Kopplung des detektierten Lichtes vom Mikroskop zum Spektrometer mittels Single-Mode-Faser (gute räumliche Filterung, d.h. Trennung des Probenlichts vom Untergrundlicht; streulichtarm; aber relativ starker Lichtverlust bei Einkopplung)
Mechanik / Aufbau	<ul style="list-style-type: none"> • Optimiertes Thermo-Management (Abwärme des Lasers darf Stabilität des Strahlengangs nicht beeinflussen); daher Laser außerhalb der optischen Bank faserkoppelt unterzubringen • Robustheit des mechanischen Aufbaus ist kritische Voraussetzung für präzise Messungen und Wartungsarmut, Design-Alternativen optische Grundplatte vs. Käfig; Verhalten bei Temperatur-Änderung zu beachten • Leichte mechanische Zugriffs- und Reinigungsmöglichkeiten auf alle Komponenten erforderlich • Anfahrergenauigkeit ist wichtiger kritischer Parameter 2 µm. • Laser-Sicherheit entsprechend dem CE-Standard, • Möglichkeit zur Inter-Geräte-Übertragbarkeit der Meßdaten muß gegeben sein, daher muß Gerätefunktion stabil sein; gerätespezifische Quellen der Transmissionsunterschiede im Strahlengang müssen weitgehend bekannt sein;.

2.2 Gerätekonzept: Inverses Mikroskop

Bereits in der frühen Konzeptphase fiel die Entscheidung zugunsten eines **inversen Mikroskop-Aufbaus** (Objektiv unterhalb der Probe). Diese Konfiguration wurde aus mehreren strategischen Gründen gewählt:

Optische Pfadlänge: Der inverse Aufbau ermöglichte deutlich kürzere optische Pfade zwischen Objektiv und Messobjekt im Vergleich zu aufrechten Mikroskopen. Dies ist essenziell, um lichtstarke Objektive mit geringen Arbeitsabständen (ca. 1 mm) bei gleichzeitigem Einsatz von Assay-Chips nutzen zu können.

Mechanische Stabilität: Da das Objektiv, die Tubuslinse und Umlenkspiegel fest auf der optischen Bank montiert werden können, entfällt die Befestigung an einem schwingungsanfälligen Turm. Dies sorgt für „zitterfreie“ Bilder und stabile Spektren.

Kosten und Kompaktheit: Die mechanisch einfachere Konstruktion begünstigt eine kompakte Bauweise und senkt die Herstellungskosten.

2.3 Probenanforderungen

Das Lastenheft definiert flexible Anforderungen an die Probenart:

Probenmatrix: Das Gerät muss sowohl trockene Proben auf festen Substraten als auch Bakterien in fluider Matrix (z. B. in Assay-Chips) messen können.

Mikrokolonien: Statt einzelner Bakterienzellen fokussierte sich die Strategie auf Mikrokolonien (ca. 10 µm Größe), die etwa 10–20 µm über dem Chipboden schweben.

Chip-Boden: Da die Messung durch den Boden des Chips erfolgt (ca. 400 nm Quarzglas oder Polymer), wurde frühzeitig die Notwendigkeit **deckglaskorrigierter Objektive** identifiziert, um optische Verzerrungen zu minimieren.

2.4 Technische Umsetzung und Komponentenwahl

2.4.1 Auswahl der Laserquelle

Die Wahl der Anregungswellenlänge war ein kritischer Balanceakt zwischen Signalstärke und Fluoreszenzvermeidung. Die Wahl der Laserwellenlänge ist entscheidend: Im niederenergetischen VIS-Bereich wird wenig Fluoreszenz angeregt, aber auch das Raman-Signal sinkt bei längeren Wellenlängen. Das Optimum hängt von der Anwendung und den Eigenschaften der Probenmatrix ab. Die Laserwahl beeinflusst außerdem Filter, Spiegel sowie die Zerstörschwelle biologischer Partikel und mögliche Interaktionen mit Matrixpartikeln. Stabilität, Linienbreite (<0,1 nm), Geeignete Wellenlängen sind 560, 633 und 680 nm. Diodenlaser sind meist kleiner und kühlen besser als DPSS-Laser. Verschiedene Systeme werden getestet und anhand Raman-Spektren bekannter Substanzen verglichen, um eine datenbasierte Entscheidung zu ermöglichen.

Geeignete Wellenlängen sind 560, 633 und 680 nm. Diodenlaser sind meist kleiner und kühlen besser als dpss-Laser. Verschiedene Systeme werden getestet und anhand Ramanspektren bekannter Substanzen verglichen, um eine datenbasierte Entscheidung zu ermöglichen.

Gegen 532/560 nm: Diese Wellenlängen wurden verworfen, da sie im Absorptionsbereich von Häm (Blutbestandteil) liegen und starke Resonanz-Effekte oder Fluoreszenz erzeugen würden.

Gegen 785 nm: Für diesen Bereich waren keine ausreichend empfindlichen Detektoren verfügbar.

Entscheidung: Es wurde ein **633 nm Diodenlaser** gewählt.

Spezifikation: Der Laser verfügt über ein Volumen-Bragg-Gitter zur Wellenlängenstabilisierung und eine Single-Mode-Faserkopplung für ein sauberes Strahlprofil.

2.5 Aufbau eines Demonstrators

Um zügig valide Testmessungen durchführen zu können, wurde dieses AP im Vergleich zum ursprünglichen Arbeitsplan vorgezogen. Hierbei waren die feststehenden bzw. realisierten Komponenten Laser, Probe/Probenhalter und Spektrometer mit der optischen Bank des Raman-Aufbaus zu integrieren. Das Licht aus der Glasfaser vom Laser passiert dabei den Shutter (der für die Synchronisation der Laser-Anregung mit der Meßzeit des Spektrometers sorgt) sowie ein Graufilter zur Anpassung der Laser-Intensität (diese ist beim gewählten Laser nicht direkt durch die Ansteuerung wählbar) und zwei Laser-Linienfilter. Diese sorgen für möglichst monochromatisches und damit für Raman-Spektroskopie geeignetes Anregungslicht. Nachdem das gefilterte Laserlicht durch das 100x-Objektiv die Probe erreicht hat, kann das von der Probe rückwärtig gestreute Licht durch das Objektiv eingesammelt und wieder der optischen Bank zugeleitet werden, wo es auf dem Weg zum spektrometerseitigen Faserkoppler zwei Kantenfilter passiert, die elastisch gestreute Lichtanteile herausfiltern. Die Performance des vorliegenden Gesamt-Aufbaus wurde anhand der Kriterien aus AP E 2.1 erfolgreich bewertet und für gut befunden.

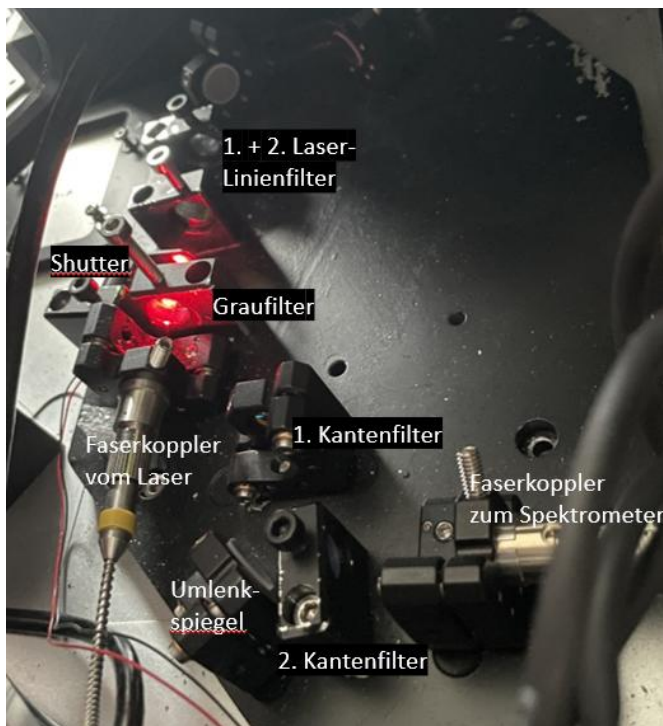


Abbildung 2: Optische Bank des Raman-Demonstrators. Das Anregungslicht vom Laser passiert den Shutter, ein Graufilter sowie zwei Linienfilter, gelangt durch das Objektiv (nicht im Bild) zur Probe. Rückgestreutes Licht wird wiederum vom Objektiv eingesammelt und über zwei Kantenfilter in die Faser eingekoppelt, die es zum Spektrometer leitet.

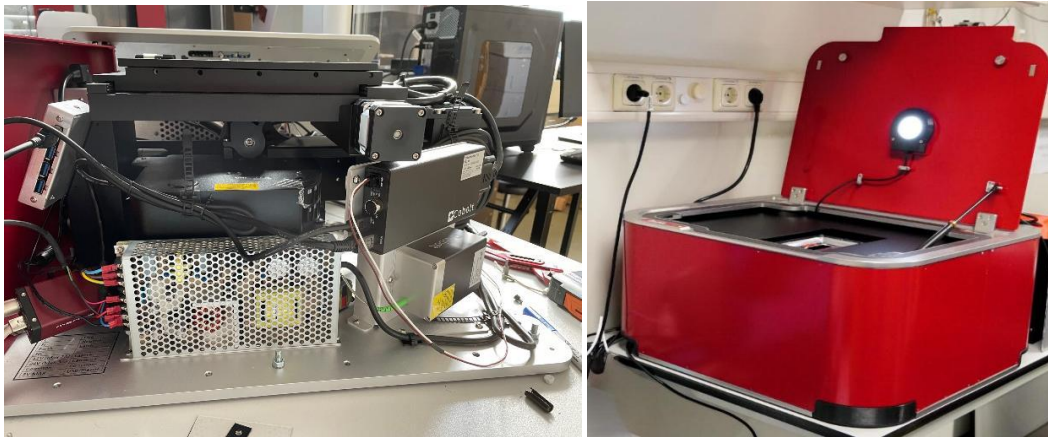


Abbildung 3: ChipReader-Demonstrators. Links zu Beginn der Systemintegration; rechts nach Auslieferung an die Uniklinik in Jena

2.5.1 Thermische Stabilität und Drift-Tests

Ein zentrales Problem bei Langzeitmessungen ist die thermische Drift des Probenhalters. Hierzu wurden umfangreiche Materialtests mit Kunststoff, Aluminium, Stahl und Keramik durchgeführt

Der **Aluminium-Halter** erwies sich als thermisch am stabilsten. Plastik und Gips zeigten deutliche Drifts (insbes. in z-Richtung). Interessanterweise zeigte sich, dass die Drift mit der Zeit abnimmt, da sich die Temperatur des Halters asymptotisch an die Gerätetemperatur angleicht.

Drift der Laserposition

Potentiell kommen für eine Drift des Laser-Auftreffpunktes sowohl eine (thermische oder mechanische) Drift des Probenträgers infrage als auch Stabilitätsprobleme des Lasers selbst oder der Justage seines Strahlengangs. Die Drift des Auftreffpunktes zu minimieren, ist daher eine Anforderung an das Gesamtsystem. Für die raman-spektroskopische Vermessung der avisierten Bakterienwolken im Assay-chip sollte die Wiederholgenauigkeit des Laser-Auftreffpunktes vsl. besser als $< 2 \mu\text{m}$ in jeder räumlichen Richtung sein, um sicherzustellen, daß auch ein aufgeweiteter Fokus vollständig innerhalb einer Bakterienwolke liegt, wodurch die höchste Raman-Intensität zu erwarten ist.

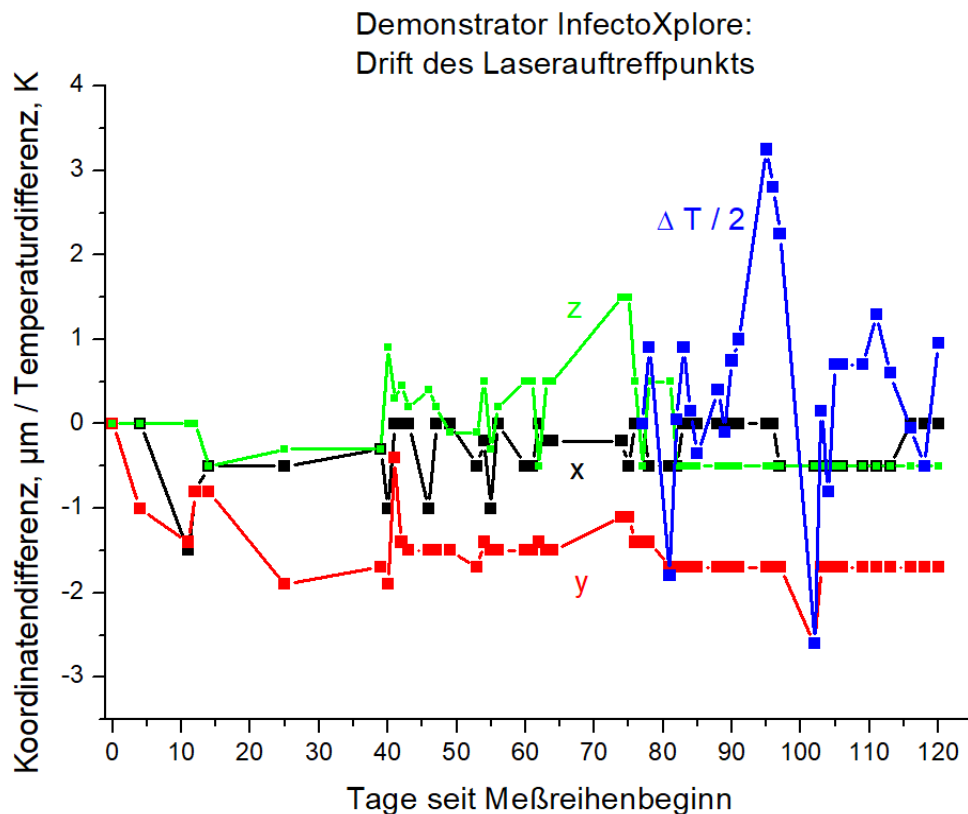


Abbildung 4: Zur zeitlichen Stabilität der Fokussierung des Laserstrahls: Drift des tatsächlichen Laser-Auftreffpunktes gegenüber der ursprünglichen Einstellung, bei der der Laserfokus möglichst exakt auf den optischen Fokus (Fadenkreuz in der Mitte des optischen Bildes) ausgerichtet wird. Dargestellt sind die Abweichungen für die drei Raum-Koordinaten.

Abb. 4 zeigt die Drift des Laser-Auftreffpunktes über einen Zeitraum von ca. 4 Monaten. Evident ist, dass es keine markante Tendenz in der Drift gibt, und der Umfang der auftretenden Drift durch einen permanenten Betrieb der Geräte-Software (angewandt ab Tag 85) stark minimiert wird (ca. $< 1 \mu\text{m}$ in jeder Dimension), so dass bei ortsfestem Betrieb ohne mechanische Störungen vsl. eine wöchentliche Überprüfung des Fokuspunktes und eine monatliche Nach-Justage ausreichend erscheint. Die Lage des Fokuspunktes für die Daten in Abb. 4 wurde dabei vertikal durch Messung der Signalstärke des Raman-Peaks auf einer glatten Si-Oberfläche und lateral durch geometrische Ausmessung der Abweichung zwischen optischem Fokus im mikroskopischen Bild und Laser-Einschußloch (1 s) in einer dünnen Farbstoffschicht auf einem (thermo-mechanisch sehr stabilen) Glasträger bestimmt.

Im Sinne eines möglichst realistischen Tests der Trefferquote sollte diese durch eine automatische Messung von 500 Spektren von *B. subtilis* auf einer getrockneten, filtrierten Probe bewertet werden. Als „getroffen“ wurde ein Keim gezählt, wenn der Phenyl-Alanin-Peak seines Raman-Spektrums eine Signalhöhe hatte, die das Rauschen des Spektrums um mehr als das Dreifache überstieg. Die so formulierte Anforderung einer Trefferquote von mind. $> 60\%$ ist im Hinblick auf die Größe der Bakterienwolke im Assaychip sehr (evtl. unnötig) streng; eine hohe erzielte Trefferquote ist dann aber souverän hinreichend für die Vermessung der Assay-Probe und ermöglicht zudem eine einfache Querverwendung des Gerätes für andere Anwendungsszenarien.

In den Aspekt der so definierten Trefferquote gehen neben der Justage-Qualität und der thermischen und mechanischen Stabilität über die Proben-Meßzeit hinweg auch der spektrale,

die Art der optischen Detektion (Dunkelfeld oder Fluoreszenzfeld) und die Gefahr des Verbrennens des Ziel-Keims durch den Laser ein. Mit Blick auf das Einsatz-Szenario des Assay-Chips sollten für die hier betrachtete Testmessung ungefärbte Keime benutzt werden.

Es konnte sich eine sehr zufriedenstellende Trefferquote von 85% für automatisch generierte 500 Spektren von *B. subtilis* (Meßzeit 10 s je Keim) auf einer Meßfläche von 10 x Bildfeldern (1 x 1 mm²) erreicht werden.

2.6 Spektrometer-Design

Basierend auf den Vorarbeiten in diesem Projekt, spezifiziert das Lastenheft folgende Anforderungen an das Spektrometer:

- Fastie-Ebert-Geometrie
- Verwendung eines zusätzlichen Umlenkspiegels, um Faserkopplung und Kamerachip versetzt aufbauen zu können
- Strahlengang per Software berechnet und optimiert
- Verwendung eines rückwärtig beleuchteten Detektor-Chips mit aktiver Kühlstufe
- Halbwertsbreite schmaler spektraler Features und Signal-Rausch-Verhältnis in einem relevanten Test-Spektrum sollen mindestens vergleichbar zu den Werten des früheren BPE-Aufbaus sein
- Streulichtgeschützter Aufbau in einem schwarzen, komplett schließbaren Kasten

Gitterspektrometer mit Reflexionsgittern und Spiegeln (wie im Falle von Fastie-Ebert) empfehlen sich zur Verwendung im zu erforschenden Gerät wegen ihrer kompakten Aufbaumöglichkeit. Der einfachste Aufbau eines Gitterspektrometers mit Reflexionsgitter stellt die Fastie-Ebert-Konfiguration dar. Dieser Aufbau erlaubt eine sehr einfache Justage, da es nur wenige Parameter gibt.

Im zu realisierenden Laboraufbau wurde ein rückwärtig beleuchteter CCD-Chip (mit 2048 x 1064 Pixeln) mit aktiver Kühlstufe verwendet werden. Abb.5 zeigt den berechneten Strahlverlauf im Spektrometer. Eine Realisierung des optimierten Aufbaus ist Abb. 6 zu entnehmen. Das aktuell verwendete Beugungsgitter der Größe 2,2 x 2,2 cm² besitzt eine Strichdichte von 1200 mm⁻¹.

Die erzielbare Auflösung bestimmt sich aus der gemessenen Linienbreite schmaler Spektrallinien, wie z. B. jenen einer He-Ne-Spektrallampe. Abbildung 7 zeigt, daß diese wie zu erwarten im Zentrum der optischen Abbildung am geringsten ist (ca. 2,4 px), während sie beidseitig zu den Randbereichen der Abbildung hin zunimmt.

Die Performance des Spektrometers ist bezüglich Signal-Rausch-Verhältnis und Auflösung mit einem kommerziellen Horiba-Spektrometer mit Andor-Newton-Detektor verglichen worden. Als Testgegenstand war ein Raman-Spektrum eines Einzelbakteriums von *Bacillus Subtilis* zu verwenden. Abb. 8 verdeutlicht, daß das hier verwirklichte Spektrometer ein vergleichbares Signal-Rausch-Verhältnis bietet wie das kommerzielle Gerät. Schmale spektrale Features wie die Phenylalanin-Linie bei 1012 WZ werden in beiden Aufbauten mit gleicher Halbwertsbreite abgebildet. Die optische Leistung des Aufbaus kann daher als gut und den Anforderungen genügend bewertet werden.

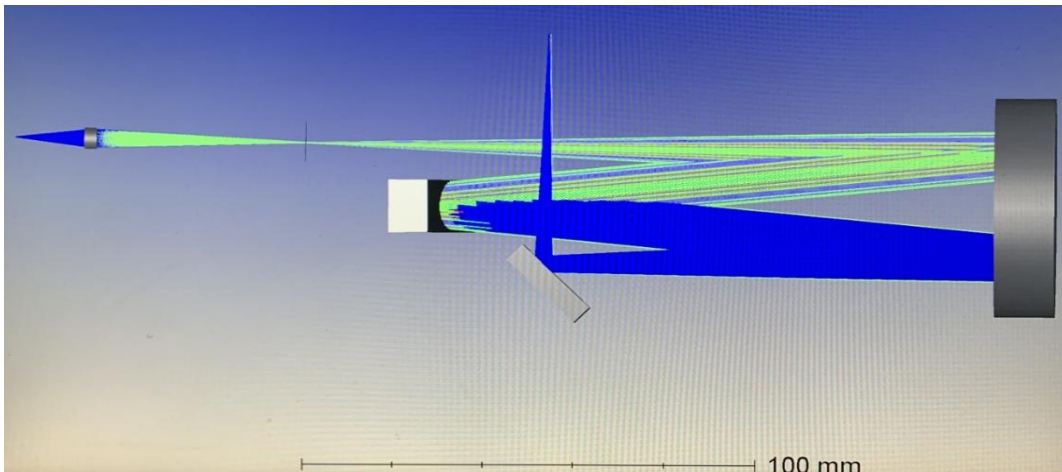


Abbildung 5: Strahlengang im Spektrometer, berechnet mit dem Programm Zemax. Von links nach rechts: Faser-Ende („Input“), Achromat-Linse bildet dieses auf das Eintrittspinhole ab (dreifache Vergrößerung), Ebertspegel $f=150\text{mm}$, Gitter, Ebertspegel, 45° Umlenkspiegel auf den CCD-Chip (nicht im Bild).

Wichtige Leistungsspezifikationen

Spektralbereich: Deckt typischerweise bis $200\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ Raman-Verschiebung ab.

Spektrale Auflösung: 8 cm^{-1} , während Standard-/tragbare Geräte etwa bieten.

Lasieranregungsquellen: Zu den gängigen Wellenlängen gehören 633 nm (sichtbar),.

Detektor: Thermoelektrisch gekühlte (2-stufige Peltier) CCD- -Detektoren 2048 Pixeln Hamamatsu.

Beugungsgitter: Typischerweise 1200 Linien/mm , oft mit mehreren Gittern in einem System für mehr Flexibilität.

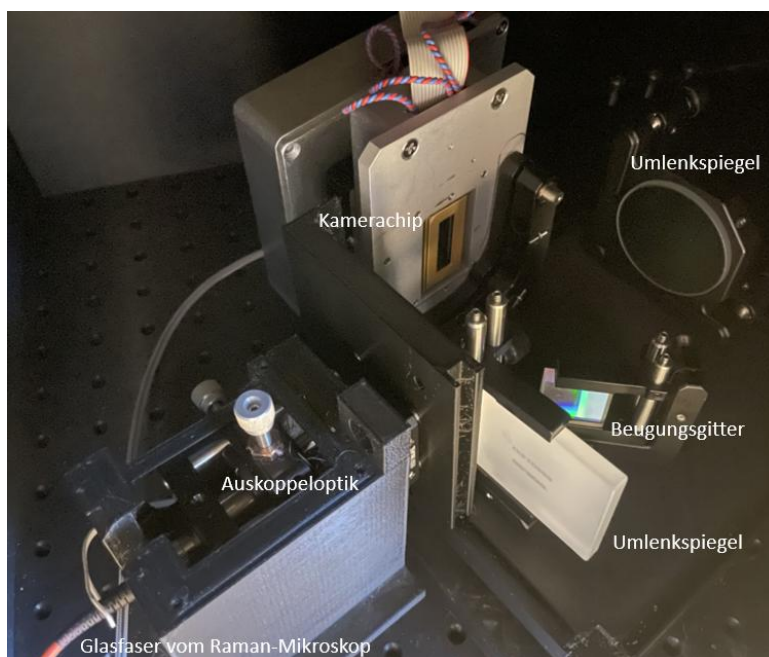


Abbildung 6: Optische Bank des selbstgebauten Spektrometers. Das in der Glasfaser herangeführte Raman-Licht wird ausgekoppelt, trifft auf den oberen Umlenkspiegel, wird dann

vom Dispersionsgitter spektral zerlegt und wieder auf den oberen Umlenkspiegel (an einer anderen Stelle) geworfen.

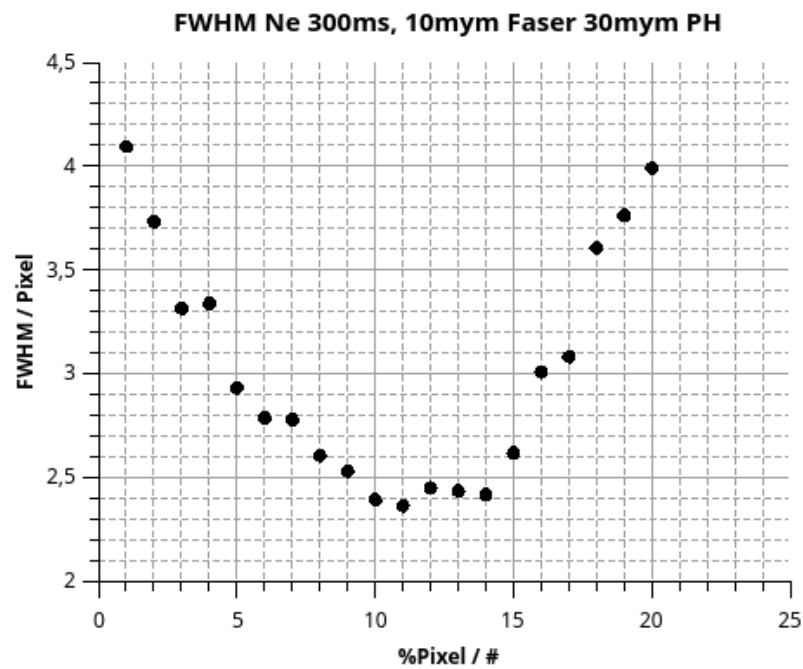


Abbildung 7: Halbwertsbreite der Spektrallinien einer He-Ne-Lampe, gemessen mit dem realisierten Spektrometer-Aufbau. Im Zentrum der optischen Abbildung ist die Halbwertsbreite am geringsten und gleicht nahezu der natürlichen Linienbreite, während sie in Richtung der Randbereiche der Abbildung allmählich unweigerlich größer wird.

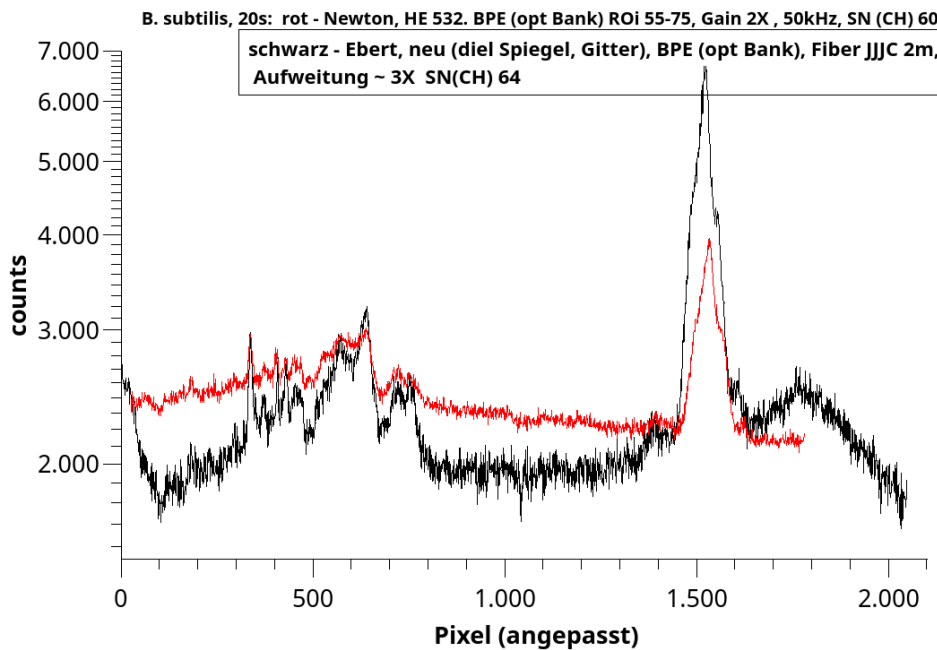


Abbildung 8: Vergleich der von einem B.subtilis-Keim generierten Spektren, einmal mit dem Andor-Newton-Spektrometer (rot), mit dem hier gebauten Spektrometer (schwarz); beide jeweils an die gleiche optische Bank des Chipreaders angeschlossen.

2.7 Software und Automatisierung

Die Software wurde von Grund auf neu programmiert. Der eigentliche Messablauf ist in Abb. 9 dargestellt. Durch die Automatisierung konnte der Messzeit auf 25 % einer manuellen Messung verringert werden.

Das vorliegende Flussdiagramm visualisiert den automatisierten Steuerungsalgorithmus eines Raman-Spektrometers, das zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen auf einem Mikrofluidik-Chip eingesetzt wird. Der Prozess gliedert sich in eine initiale Kalibrierungsphase und eine sich wiederholende Messschleife. Die Sequenz Autofokus, Bildaufnahme, Spektrenaufnahme muss zu 4 unterschiedlichen Zeiten mit 2 Antibiotika mit 6 Konzentrationen für eine Patientenprobe (1 Probe = 1 Patient) durchlaufen werden.

1. Initialisierung und Lagekorrektur

Nach dem **Start** des Programms führt das System zunächst Schritte durch, um die genaue Position des eingelegten Chips zu verifizieren:

Anfahrt Startpunkt: Das System fährt eine definierte Referenzposition oder ein spezifisches Merkmal auf dem Chip an.

Bestimmung des Versatzes: Da der Chip durch das manuelle Einlegen leicht verschoben sein kann, ermittelt das System den exakten Versatz (Offset). Dies ist entscheidend, um sicherzustellen, dass die folgenden mikroskopischen Messungen die Bakterien/Proben exakt treffen.

2. Der Messzyklus (Iterativer Prozess)

Nach der Lagekorrektur beginnt die eigentliche Datenerfassung. Dieser Block wird so oft wiederholt, bis alle geplanten Messungen durchgeführt sind:

Anfahrt Messpunkte: Die Motorsteuerung bewegt die Optik zum nächsten definierten Koordinatenpunkt auf dem Chip.

AF (Autofokus): Das System führt eine automatische Fokussierung durch. Dies ist für Raman-Messungen kritisch, um den Laserfokus exakt auf die Ebene der Bakterien zu legen und das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

Bildaufnahme: Es wird ein mikroskopisches Bild der aktuellen Position erstellt (z. B. zur Dokumentation der Zelldichte oder Morphologie).

Spektrenaufnahme: Das Raman-Spektrum wird aufgenommen. Dies ist der analytische Kernschritt, dessen Daten später ausgewertet werden, um phänotypische Veränderungen der Bakterien unter Antibiotikaeinfluss zu erkennen.

3. Prozesssteuerung und Ende

Nach jeder Messung folgt eine logische Überprüfung:

Abfrage „max Anzahl Zyklen“: Das System prüft, ob die vordefinierte Anzahl an Messungen oder Zeitpunkten erreicht wurde.

Nein: Der Prozess springt zurück zum Schritt „Anfahrt Messpunkte“. Der nächste Zyklus beginnt.

Ja: Das Abbruchkriterium ist erfüllt. Der Ablauf endet (**Ende**), und das Gerät steht für die Datenauswertung oder Entnahme des Chips bereit.

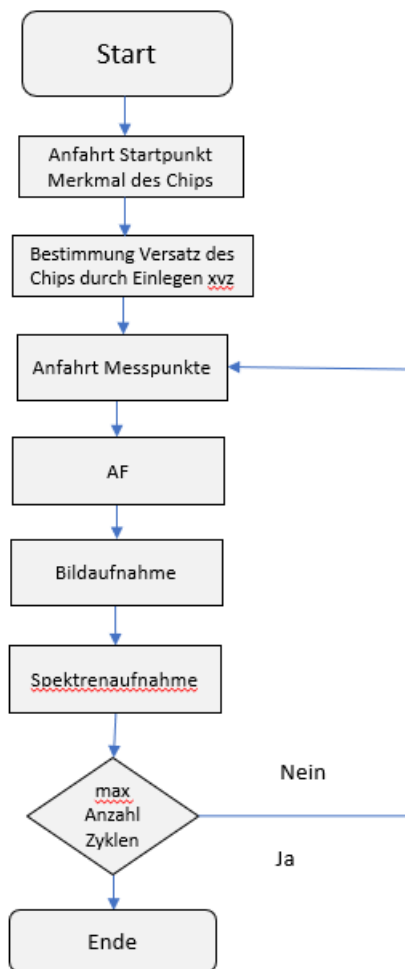


Abbildung 9: Flussdiagramm für die Steuerung des Messablaufes des Demonstrators.

Die graphische Benutzeroberfläche mit Ihren Steuerelementen ist in Abb. 10 dargestellt. Ein weiterer Gesichtspunkt der Entwicklung war die Bilddokumentation zur automatischen Aufnahme von Bildern der Probe vor und nach der spektralen Messung zur Qualitätssicherung.

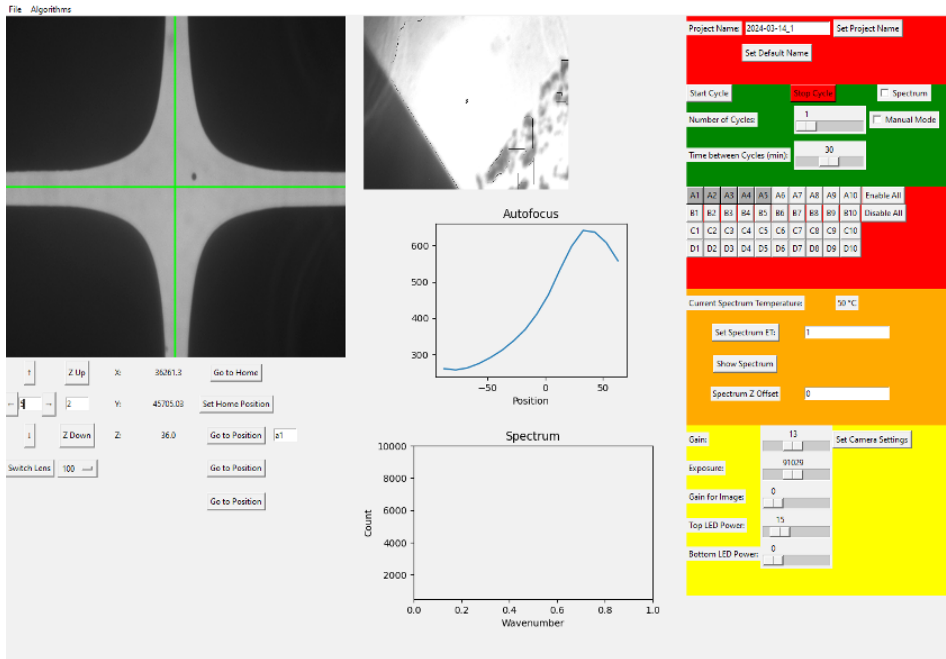


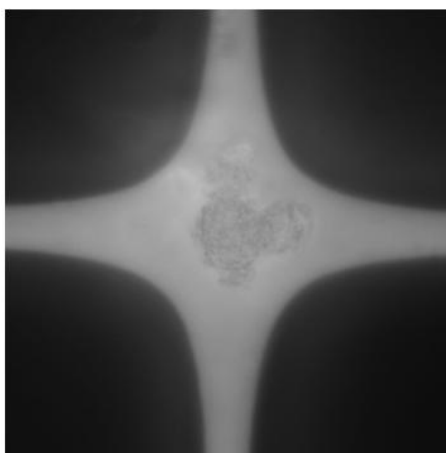
Abbildung 10: Softwareoberfläche zur Steuerung des Messablaufes des Demonstrators. Links oben sind die Elektroden des DEP Chips zur Kontrolle der Bakterienwolken zu sehen. Die roten Felder dienen zur Positionsauswahl der Chipkoordinaten während das gelbe Feld zur Kamerasteuerung dient.

2.8 Finale Objektiv-Auswahl und Laseranpassung

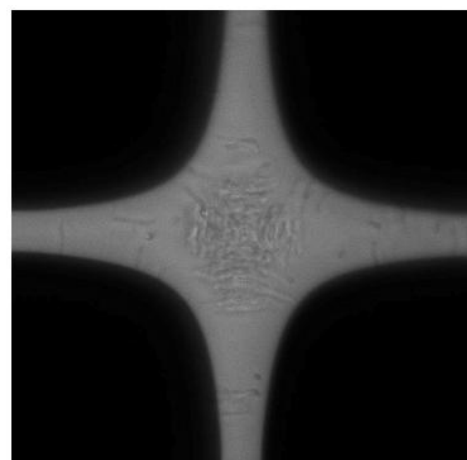
Ein entscheidender Schritt zur Verbesserung der Signalqualität war der Vergleich verschiedener Objektive:

Ein Ölimmersionsobjektiv lieferte zwar das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis, wurde jedoch aufgrund des hohen Reinigungsaufwands für Routineanwendungen als unpraktisch eingestuft.

Die Wahl fiel auf das **Evident UPLanFL 60x**. Dieses deckglaskorrigierte Objektiv lieferte eine signifikant bessere Bildqualität (vgl. Abb. 11) und Performance (vgl. Abb. 12) als das zuvor genutzte 100x-Objektiv von Shanghai Optics.



Objektiv ohne
Korrektur



deckglaskorrigiertes Objektiv

Abbildung 11: Aufnahmen eines Messfeldes des Chis mit dem bislang verwendeten 100x Objektiv der Firma Shanghai Optics und dem neuen 60x deckglaskorrigierten Evident UPLanFL Objektivs.

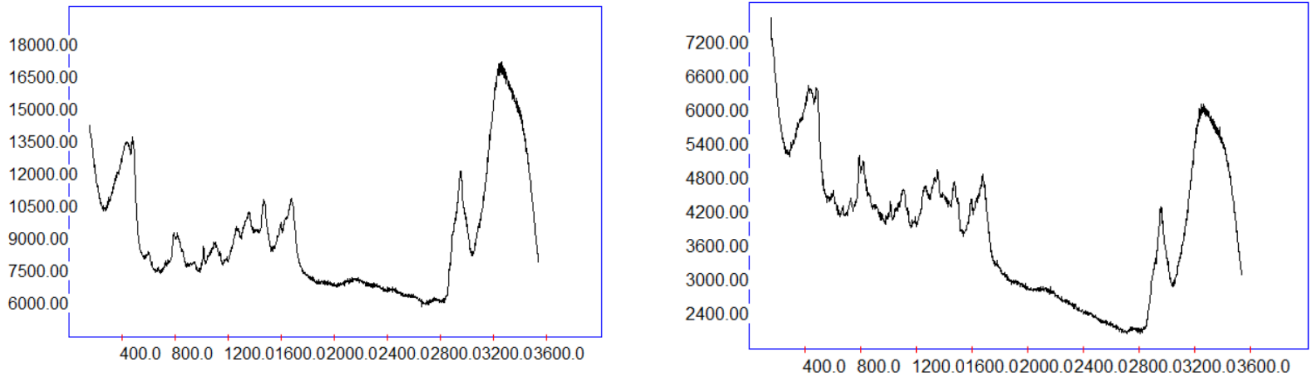


Abbildung 12: Raman Spektren von E. coli in einem Messfeld des Chips mit dem bislang verwendeten 100x Objektiv der Firma Shanghai Optics (rechts) und dem neuen 60x deckglaskorrigierten Evident UPLanFL Objektivs (links). Das verbesserte Signal zu Rausch Verhältnis ist sichtbar. Das Signal verdoppelt sich etwas bei gleicher Integrationszeit und Laserintensität

2.8.1 Umbau der roten Laseranregung zu höheren Leistungen

Während der ersten Untersuchungen zeigt sich, dass die Laserleistung des verwendeten Lasers von 35 mW nicht ausreichen. Laser mit einer Faserkopplung mit einer höheren Leistung waren nicht verfügbar. Daher wurde das Gerät mit einem Free Space Laser ausgerüstet und die Einkopplungsoptik entsprechend angepasst

3 Fazit und Projekterfolg

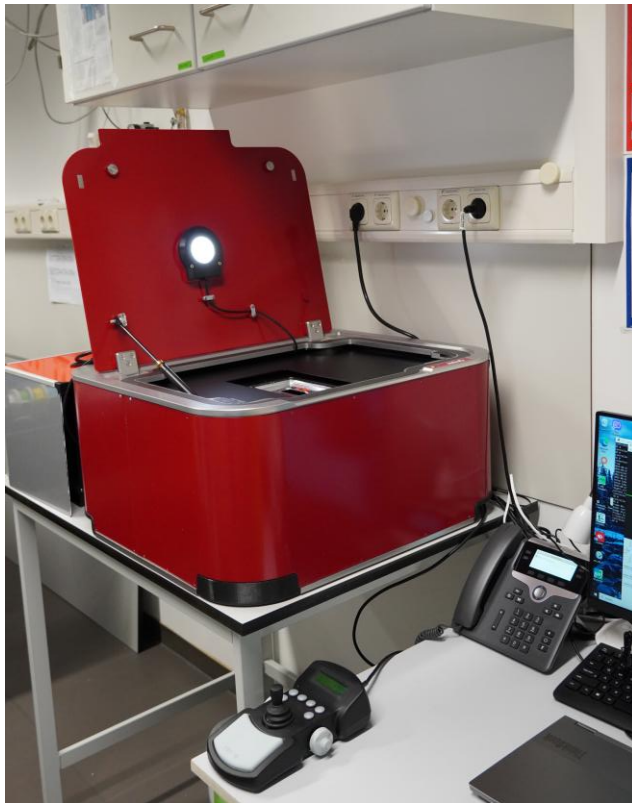


Abbildung 13: Der Chipreader nach Installation in der Uni-Klinik Jena

Das Projekt mündete in einer erfolgreichen Messkampagne am 15.10.2024 und 15.03.2025 in Berlin, die die Leistungsfähigkeit und auch Verbesserungspotentiale des Gesamtsystems demonstrierten. Anschließend wurde das Gerät in die Universitätsklinik in Jena geliefert (vgl. Abb.13). Nach der Installation wurde in weiteren unabhängigen Messreihen die Alltagstauglichkeit getestet.

Es konnte eine vollständige **MIC-Bestimmung** (Minimale Hemmkonzentration) durchgeführt werden und damit das **Hauptziel erreicht werden**.

Vergleichsmessungen an *E. coli* zeigten, dass das optimierte System (633 nm Laser, Evident 60x Objektiv, stabilisierter Halter) qualitativ hochwertige Raman-Spektren liefert, die eine präzise Diagnostik ermöglichen.

Abschließend wurden antimikrobiellen Empfindlichkeitstests mit dem RamanBioAssay auf dem neuen ChipReader und dem alten manuellen Verfahren durchgeführt. Die Untersuchung umfasste Patienten-Isolate von *E. coli* (S+R), *S. aureus* (S+R), 4 Antibiotika-Konzentrationen und jeweils 3 Replikate. Die Messergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Messzeit konnte bei Verwendung des Chipreaders von 40 bzw 70 min auf 17 min reduziert werden bei nahezu gleicher Genauigkeit.

Tabelle 2. Zusammenfassung der Vergleichsmessung des manuellen Systems und des Chipreaders (InfectoXplorer)

	Renishaw inVia off-the-shelf	InfectoXplorer (633 nm) -> für RBA optimiert
E. coli + CIP	97 %	92 %
S. aureus + OXA	99%	99%
Messzeit pro AST	40 - 70 min, manuell	17 min, automatisch