

Imię i nazwisko autora rozprawy: Patryk Sokołowski

Dyscyplina naukowa: automatyka, elektronika, elektrotechnika i technologie kosmiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Opracowanie optycznych metod badania wybranych parametrów tkanek biologicznych oraz ich fantomów

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Development of optical methods of measurement representative parameters of biological tissues and tissues phantoms

Promotor
<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Małgorzata Szczerska

Gdańsk, 2026

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Patryk Sokołowski

Ja, niżej podpisany, oświadczam, iż jestem świadomy, że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Opracowanie optycznych metod badania wybranych parametrów tkanek biologicznych oraz ich fantomów

do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr hab. inż. Małgorzatą Szczerską.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotniać w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.

Streszczenie

Niniejszą pracę poświęcono metodom optycznym stosowanym do pomiarów i monitorowania wybranych parametrów tkanek biologicznych oraz fantomów imitujących tkanki i płyny biologiczne. Metody optyczne i ich zastosowania przedstawione w rozprawie miały na celu adaptacje istniejących metod optycznych do nowych zastosowań, a także opracowanie i realizację czujników światłowodowych i zbadanie właściwości materiałów o potencjale zastosowania w fantomach odzwierciedlających optyczne właściwości tkanek lub płynów ustrojowych.

W pracy opisano poznane podczas badań metody takie jak spektroskopia absorpcyjna, interferometria i refraktometria realizowana w technikach światłowodowych, które pozwoliły na opracowanie własnych czujników. Niniejsza praca obejmuje opisy konstrukcji czujników światłowodowych oraz systemów pomiarowych, jak również prezentacje wyników i analizy pomiarów eksperymentalnych. Omówiono zalety oraz specyficzne wymagania czujników w kontekście zastosowań do pomiarów materiałów biologicznych. Opracowane czujniki światłowodowe zastosowano do detekcji biomarkerów charakterystycznych dla wirusów oraz infekcji wirusowych. Zaproponowano wykorzystanie metod spektroskopowych, które zaimplementowano do pomiarów i monitorowania zmian w widmie absorpcyjnym w złożonych matrycach biologicznych, jakimi są ścieki oraz ludzki mocz. Przedstawiono wyniki badań nad opracowaniem fantomu ludzkiego moczu, odzwierciedlającego widmo absorpcyjne w zakresie UV–VIS oraz przydatność do walidacji układów pomiarowych. Przeprowadzono również przegląd aktualnego stanu wiedzy oraz pomierzono wybrane właściwości optyczne produktów spożywczych, które mogą odwzorowywać właściwości optyczne ludzkiej tkanki.

W zakończeniu pracy podsumowano całość przeprowadzonych badań, omawiając główne osiągnięcia doktoranta oraz przedstawiając dalsze perspektywy badań w obszarze optycznych metod pomiarowych.

Abstract

This dissertation is devoted to optical methods used for the measurement and monitoring of selected parameters of biological tissues and phantoms that mimic tissues and biological fluids. The studies presented in this work aimed to develop and implement fiber-optic sensors, to adapt existing optical techniques to new applications, and to investigate the properties of materials with potential use in phantoms replicating the optical characteristics of tissues or bodily fluids.

The dissertation describes the methods explored during the research, including absorption spectroscopy, interferometry, and refractometry implemented in fiber-optic configurations, which enabled the development of original sensing solutions. This work encompasses detailed descriptions of the construction of fiber-optic sensors and measurement systems, as well as the presentation and analysis of experimental results. The developed fiber-optic sensors were applied to the detection of biomarkers characteristic of viruses and viral infections. Spectroscopic techniques were proposed, implemented, and adapted for the measurement and monitoring of changes in the absorption spectrum of complex biological matrices, such as wastewater and human urine. The results of research on the development of a human-urine phantom reproducing the UV–VIS absorption spectrum are also presented. Moreover, a review of the current state of the art was conducted, and selected optical properties of food products that may mimic the optical behavior of human tissues were measured.

Finally, the dissertation concludes with a summary of the main achievements of the doctoral candidate and outlines future research perspectives in the field of optical methods.

Wykaz prac wchodzących w skład pracy doktorskiej

[A] Patryk Sokołowski, Paweł Wityk, Joanna Raczak-Gutknecht, Wiktoria Brzezińska, Michał Sobaszek, Paweł Kalinowski, Sebastian Garcia-Galan, Małgorzata Szczerska; Optical Method for the Detection of Viral RNA Using an Optical Fiber Sensor, Journal of Biophotonics 2025, <https://doi.org/10.1002/jbio.202500063> (IF 2.3, 100pkt)

[B] Patryk Sokołowski, Maria Babińska, Paweł Wityk, Joanna Raczak-Gutknecht, Karolina Rychter, Grzegorz Orlicki, Małgorzata Szczerska, Fiber Optic Biosensor for the Detection of Influenza Viral RNA, Sensors and Actuators B: Chemical (w recenzji)

[C] Małgorzata Szczerska, Kacper Cierpiak, Monika Kosowska, Paweł Wityk, Sebastian Garcia-Galan, **Patryk Sokołowski**, Sylwia Fudala-Książek, Michał T. Tomczak, Bei Ye, Aneta Łuczkiwicz, Remote real-time wastewater surveillance by the optical sensor supported by machine learning, Sensors and Actuators Reports, Vol. 10, 2025, <https://doi.org/10.1016/j.snrs.2025.100346> (IF 7.6, 20pkt)

[D] Paweł Wityk, **Patryk Sokołowski**, Małgorzata Szczerska, Kacper Cierpiak, Beta Krawczyk, Michał J. Markuszewski; Optical method supported by machine learning for urinary tract infection detection and urosepsis risk assess, Journal of Biophotonics 2023, <https://doi.org/10.1002/jbio.202300095> (IF 2.3, 100pkt)

[E] Patryk Sokołowski, Kacper Cierpiak, Małgorzata Szczerska, Maciej Wróbel, Aneta Łuczkiwicz, Sylwia Fudala-Książek, Paweł Wityk; Optical method supported by machine learning for dynamics of C-reactive protein concentrations changes detection in biological matrix samples, Journal of Biophotonics 2024, <https://doi.org/10.1002/jbio.202300523> (IF 2.3, 100pkt)

[F] Patryk Sokołowski; Effect of temperature change on the refractive index of an egg white and yolk: preliminary study, Photonics Letters of Poland 2022, doi: 10.4302/plp/v14i2.ZZZ (IF 0.8, 40pkt)

[G] Patryk Sokołowski, Maria Babińska; Development of Artificial Urine Using Commonly Available Ingredients for Ultraviolet-Visible Spectroscopy; Eng. Proc. 2025, <https://doi.org/10.3390/engproc2025098005> (5 pkt)

Spis treści:

1.	Wprowadzenie	8
2.	Wykorzystanie metod optycznych do detekcji biomarkerów	12
	Aktualny stan wiedzy.....	12
2.1	Projekt głowicy czujników światłowodowych oraz konstrukcja układu pomiarowego.....	14
2.2	Światłowodowy czujnik do detekcji RNA wirusów.....	17
2.2.1	Detekcja RNA wirusa SARS-CoV-2.....	20
2.2.2	Detekcja RNA wirusa grypy typu A.....	21
2.3	Światłowodowy czujnik do detekcji białka IgG	23
3.	Wykorzystanie spektroskopii absorpcyjnej w analizie złożonych płynnych matryc biologicznych.....	26
	Aktualny stan wiedzy.....	26
3.1	Implementacja pomiarów absorpcyjnych w analizie zmian parametrów moczu.....	28
3.2	Optyczna metoda klasyfikacji zagrożenia urosepsą	29
4.	Optyczna analiza środowiskowa z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej.....	33
	Aktualny stan wiedzy.....	33
4.1	Nadzór zmian stężenia CRP w ściekach przy wykorzystaniu metod optycznych	34
4.2	Miniaturyzacja i integracja spektroskopowego układu pomiarowego	36
5.	Światłowodowa interferometria niskokoherencyjna w badaniu optycznych właściwości produktów spożywczych imitujących właściwości optyczne tkanek	41
	Aktualny stan wiedzy.....	41
5.1	Układ pomiarowy z wykorzystaniem interferometru światłowodowego	44
5.2	Charakterystyka zmian współczynnika załamania wybranych produktów spożywczych w funkcji temperatury	46
5.3	Badanie napojów mlecznych za pomocą refraktometru	50
6.	Opracowanie i charakterystyka fantomu do walidacji optycznych metod pomiarowych	55
	Aktualny stan wiedzy.....	55
6.1	Optyczny fantom sztucznego moczu do walidacji metod optycznych	56
7.	Podsumowanie rozprawy i dalsze perspektywy	58
7.1	Osiągnięcia naukowe doktoranta	59
7.2	Dalsze plany badawcze	60

Wykaz skrótów i oznaczeń

A – absorbancja

CCD – matryca światłoczuła z sekwencyjnym odczytem ładunku (Charge-Coupled Device)

CRP – białko C-reaktywne

CMOS – komplementarny półprzewodnik tlenkowy (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor)

ELISA – test immunoenzymatyczny fazy stałej (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FPI – interferometr Fabry'ego Perota (Fabry-Perot Interferometer)

FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

Φ – faza wiązki

I – natężenie promieniowania

IgG – Białko immunoglobulina G

L – długość wnęki interferometru

LED – dioda elektroluminescencyjna (Light-Emitting Diode)

λ – długość fali promieniowania

ML – uczenie maszynowe (Machine Learning)

NIR – zakres bliskiej podczerwieni

OSA – analizator widma optycznego

OD – gęstość optyczna

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PCT – prokalcytonina

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (Polymerase Chain Reaction)

RI – współczynnik załamania (Refractive Index)

RNA – kwas rybonukleinowy

SLD – dioda superluminescencyjna

SMF – światłowód jednomodowy

UHT – obróbka wysokotemperaturowa (Ultra-High Temperature)

UV–VIS – zakres bliskiego ultrafioletu oraz światła widzialnego

ZUM – zakażenie układu moczowego

1. Wprowadzenie

Metody optyczne są obecnie powszechnie stosowane ze względu na wysoką czułość, szybkość detekcji, biokompatybilność [1]. W odróżnieniu od wielu klasycznych metod analitycznych, umożliwiają bezinwazyjny pomiar lub przy minimalnej ingerencji w badaną strukturę [2]. Jest to szczególnie cenne w badaniach medycznych, gdzie liczy się bezpieczeństwo pacjenta, a liczba próbek może być ograniczona. Optyczne techniki pomiarowe nadają się do miniaturyzacji, obecnie implementowane są rozwiązania łączące cały sensor na jednej płytce [3]. Innym podejściem jest wykorzystanie światłowodu jako głowicy pomiarowej, w ten sposób możliwe są pomiary mniejszych objętości próbki również w trudnych środowiskach [4]. Światłowodową głowicę pomiarową można zaimplementować w odległości kilometrów od aparatury pomiarowej oraz tworzyć rozproszone sieci czujnikowe [5]. Poprzez postęp technologiczny wzrosła dostępność źródeł promieniowania optycznego i detektorów, między innymi dzięki rozwojowi optycznych technologii telekomunikacyjnych. Sprawia to, że metody optyczne stają się coraz łatwiej dostępne i chętnie implementowane w zastosowaniach przemysłowych, środowiskowych i biomedycznych [6].

W niniejszej pracy skupiono się na technikach optycznych bazujących na analizie sygnału w dziedzinie widma optycznego. Techniki te obejmują szeroki zakres metod, które umożliwiają analizę na podstawie interakcji promieniowania optycznego z badaną materią [7]. W ten sposób możliwe jest uzyskanie informacji o właściwościach fizycznych i chemicznych obiektu, a także monitorowanie zmian na podstawie obserwacji zmian widma [8].

Jednym z głównych celów badań było opracowanie własnych czujników światłowodowych, w oparciu o wiedzę zdobytą podczas pracy z poznanymi metodami optycznymi podczas prowadzonych badań. W celu wykonania czujników światłowodowych na końcach telekomunikacyjnych włókien światłowodowych wykonano modyfikacje geometryczne mające na celu wprowadzenie dodatkowej modulacji do wynikowego widma. Dodatkowo modyfikacja zwiększyła powierzchnię dla warstwy sfunkcjonalizowanej do detekcji biomarkerów. Zaprezentowano działanie czujników na przykładzie detekcji RNA wirusów [A, B] oraz przeciwciał [C] na podstawie monitorowania zmian rejestrowanego widma. Głowice pomiarowe pozwalają na pomiary *in situ*, a pomiar możliwy jest w interwale kilkunastu sekund. Potencjalne zastosowania czujników obejmują nie tylko badania kliniczne, ale również monitorowanie zmian stężenia biomarkerów w środowisku, np. w ściekach. Prace nad czujnikami światłowodowymi do detekcji biomarkerów były ostatnim etapem prac, wcześniejsze badania obejmują wykorzystanie technik spektroskopowych oraz światłowodowej interferometrii.

Spektroskopia, jako jedna z kluczowych techniki analizy w dziedzinie widma, umożliwia identyfikację składu chemicznego, ilościowe oznaczenie oraz monitorowanie reakcji na podstawie charakterystycznych widm emisyjnych i absorpcyjnych [9,10]. Pomiar technikami spektroskopowymi zazwyczaj zajmuje kilka sekund. Umożliwia analizę bez stosowania znaczników i odczynników chemicznych [11]. Dzięki temu metoda jest szybka i nie zaburza właściwości badanej tkanki. Jest to metoda uniwersalna z szerokim zastosowaniem w badaniach tkanek biologicznych, przez możliwość zastosowania w obszarach od biologii oraz chemii przez monitorowanie metabolizmu

komórek [12], zmian skórnych [13] do diagnostyki nowotworów [14]. W zależności od techniki, spektroskopia może obejmować zakres widma promieniowania elektromagnetycznego w szerokim zakresie długości fal od ultrafioletu, aż po promieniowanie rentgenowskie [15,16].

Spektroskopia absorpcyjna UV–VIS stosowana jest w analizie tkanek biologicznych [17–19]. Do głównych zalet metody należy szybki czas detekcji oraz możliwość pomiaru w niewielkich objętościach próbki co jest istotne w przypadku badania materiałów biologicznych. Redukcja wymaganej objętości materiału biologicznego umożliwia przeprowadzanie analiz w sytuacjach ograniczonej dostępności próbek, takich jak badania u noworodków, jednocześnie zmniejszając ingerencję w organizm pacjenta [20]. Natomiast krótki czas detekcji jest szczególnie istotny w diagnostyce ostrych stanów klinicznych, gdzie szybkie wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego może znacząco poprawić rokowanie pacjenta i ograniczyć ryzyko powikłań [21]. Dodatkowo, rozwój technologii optoelektronicznych umożliwia miniaturyzację systemów spektroskopowych oraz pozwala na stosowanie zasilania bateryjnego, co jest szczególnie istotne w kontekście rosnącego zapotrzebowaniu na urządzenia diagnostyczne działające w terenie oraz przyłóżkowe, umożliwiające szybkie uzyskanie wyników bezpośrednio przy pacjencie [22].

W pracy przedstawiono badania oraz analizę optyczną w płynnych materiałach biologicznych z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV–VIS. Zaprezentowano metodę optyczną opartą na spektroskopii do szybkiej klasyfikacji zmian w moczu spowodowanych przez zakażenie układu moczowego oraz zmiany urosepsowe [D]. Decyzję o badaniach w moczu podjęto ze względu na nieinwazyjność poboru próbki moczu oraz możliwie szeroki zakres parametrów diagnostycznych [23,24]. Doświadczenie w pomiarach spektroskopowych na płynnych próbkach biologicznych o złożonym składzie przyczyniło się do wyboru kolejnego obiektu badań jakim były ścieki. Opracowano i zaimplementowano metodę spektroskopową, która posłużyła do monitorowania dynamiki zmian stężenia biomarkerów w ściekach [E]. Nadzór ścieków umożliwia wczesne wykrywanie nowych zagrożeń zdrowotnych oraz ognisk chorób [25].

Kolejną techniką umożliwiającą analizę sygnału w dziedzinie widma optycznego jest interferometria niskokoherencyjna. Przy wykorzystaniu zjawiska interferencji fal możliwe jest precyzyjne określanie grubości warstw oraz współczynnika załamania [26,27]. Na podstawie zmian współczynnika załamania można wskazać na różnice w strukturze badanej próbki, w tym wskazać obecność zmian patologicznych, np. w tkankach i krwi [28,29]. Interferometr jest możliwy do zrealizowania przy wykorzystaniu światłowodów, co zostało przedstawione w niniejszej pracy. Przedstawiono badania mające na celu charakteryzację optyczną wybranych produktów spożywczych [F], jako kluczowy parametr wybrano współczynnik załamania i jego zmianę w funkcji temperatury. Uzyskane wyniki mogą posłużyć zarówno do wytworzenia fantomów imitujących tkanki biologiczne jak również mogą zostać wykorzystane do kontroli świeżości produktów spożywczych.

Wraz z rozwojem metod pomiarowych pojawiła się potrzeba stworzenia odpowiednich materiałów walidacyjnych. Materiały biologiczne są trudne do standaryzacji, ze względu na złożoność składu, dodatkowo ulegają procesom degradacji, przez co ich parametry mogą ulegać zmianie, dlatego rośnie zapotrzebowanie na fantomy imitujące właściwości optyczne tkanek [30]. Parametry fantomów mogą

być stabilne w czasie, umożliwiając testowanie metod optycznych w warunkach kontrolowanych bez potrzeby uzyskiwania zgód bioetycznych. Właściwie zaprojektowany fantom odwzorowuje wybrane właściwości optyczne, takie jak współczynnik załamania czy absorpcja na wybranym zakresie długości fal [31]. Fantomy można dostosowywać do specyfiki badań i symulować różne stany patologiczne [32]. W pracy przedstawiono realizację fantomu imitującego widmo absorpcyjne moczu [G].

Główne zadania badawcze zrealizowane w ramach pracy koncentrowały się na opracowaniu, adaptacji oraz weryfikacji wybranych technik optycznych w kontekście zastosowania w analizie materiałów biologicznych i środowiskowych, a także opracowanie własnych czujników jako główny cel pracy. Mając na uwadze powyższe, celem pracy stało się zweryfikowanie tezy: czujnik światłowodowy zbudowany z wykorzystaniem telekomunikacyjnego światłowodu jednomodowego może służyć do efektywnej detekcji wybranego biomarkera w złożonej matrycy biologicznej.

Weryfikacja tezy została zrealizowana w oparciu o obszary badawcze pracy, którą można podzielić na kilka zasadniczych segmentów:

- opracowanie i realizacja czujników światłowodowych do detekcji biomarkerów [A, B, C].
 - skupiono się na projekcie i budowie czujnika światłowodowego zakończonego mikrosferą pokrytą warstwą do selektywnej detekcji wybranych materiałów biologicznych. W ramach pracy opracowano, wykonano i przetestowano sensory optyczne do wykrywania RNA wirusów SARS-CoV-2 [A],
 - następnie zrealizowano i zbadano kolejny czujnik światłowodowy zakończony mikrosferą pokrytą warstwą selektywną na RNA wirusa grypy typu A [B],
 - zrealizowano i przetestowano trzeci rodzaj sensora światłowodowego zmieniając wykrywany biomarker, opracowując w ten sposób detekcję białek IgG [C],
- implementacja i adaptacja istniejących metod optycznych do nowych zastosowań:
 - dostosowanie i implementacja techniki spektroskopowej do warunków specyficznych dla analizowanego złożonego biologicznie materiału. Przeprowadzono badania w celu szybkiej klasyfikacji pacjentów ze stanem urospęstycznym [D], jak również do nadzoru stężenia biomarkera w ściekach jako wskaźników zagrożeń środowiskowych [E],
 - implementacja niskokoherentnego interferometru Fabry'ego-Perota do pomiarów współczynnika załamania produktów spożywczych [F], mających potencjał do wykorzystania jako materiał na fantomy,
- opracowanie fantomów, które odzwierciedlają optyczne właściwości cieczy ustrojowych [G]. Wytworzone fantomy służą jako materiał walidacyjny do optycznych układów pomiarowych w warunkach laboratoryjnych.

Praca składa się z siedmiu rozdziałów. Rozdział 1 jest wprowadzeniem omawiającym techniki optyczne poznane oraz wykorzystane podczas badań. Rozdział opisuje cel i główne zadania badawcze. Rozdział 2 omawia projekt i realizację czujników światłowodowych do detekcji biomarkerów. Czujniki umożliwiają selektywną detekcję i zostały zaprojektowane do detekcji RNA wirusa. Kolejny zaprojektowany czujnik umożliwia detekcję białka immunoglobuliny G, biomarker posłużył

do monitorowania zmian stężenia w ściekach. W rozdziale 3 i 4 opisano implementację technik spektroskopowych do nowych zastosowań. Rozdział 3 przedstawia badania laboratoryjne z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej do klasyfikacji pacjentów ze stanem uroseptycznym. Natomiast rozdział 4 przedstawia wykorzystanie spektroskopii absorpcyjnej do nadzoru zmian stężenia CRP w środowisku (ściekach). Rozdział 5 omawia zalety, zastosowania oraz kierunki rozwoju metod optycznych oraz fantomów imitujących tkanki. W rozdziale zawarto wyniki pomiarów produktów spożywczych mogących posłużyć do wykonania fantomów oraz walidacji metod optycznych. Zbadany został wpływ temperatury na zmianę współczynnika załamania. W ramach rozdziału 6 opisano zrealizowany fantom moczu odzwierciedlającego widmo optyczne moczu pacjentów w zakresie UV–VIS. Powstały fantom cechuje się prostym składem i służy do walidowania metod spektroskopowych. Rozdział 7 podsumowuje wyniki rozprawy i wskazuje możliwe kierunki dalszych prac związanych z tematem.

Przedstawione w niniejszej rozprawie badania stanowią przykład interdyscyplinarnego podejścia badawczego, łączącego fotonikę, optoelektronikę oraz inżynierię biomedyczną. Połączenie wiedzy z wielu dziedzin umożliwia opracowanie nowatorskich rozwiązań technologicznych, które odpowiadają na aktualne wyzwania w obszarze monitorowania zmiany parametrów w próbkach biologicznych oraz szybkiej i nieinwazyjnej diagnostyki medycznej. Wykazano, że techniki optyczne, wspierane przez rozwój fantomów, mają istotny potencjał zarówno w kontekście badań nad właściwościami materiałów biologicznych, a także do nadzoru dynamiki zmian w czasie rzeczywistym w celach diagnostycznych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że metody optyczne stanowią perspektywiczną drogę do tworzenia narzędzi wspomagających zarówno badania podstawowe, jak i praktykę kliniczną.

2. Wykorzystanie metod optycznych do detekcji biomarkerów

W rozdziale przedstawiono opracowanie oraz walidację czujników światłowodowych do detekcji wybranych biomarkerów. Badania przeprowadzone zostały przy użyciu zrealizowanych czujników światłowodowych zakończonych mikrostrukturą. Modyfikowane czoła światłowodów zostały dodatkowo pokryte warstwami umożliwiającymi przyłączenie RNA wirusa do głowicy czujnika. Część badań dotyczących detekcji RNA wirusa SARS-CoV-2 przy wykorzystaniu czujnika zakończonego mikrosferą została opisana w artykule [A]. W podrozdziale 2.2 przedstawiono czujnik światłowodowy wraz z opisem detekcji RNA grypy typu A, część badań zawarto w artykule [B]. Prace nad czujnikami do detekcji biomarkerów w środowisku zawarto w podrozdziale 2.3, przedstawione wyniki prac nad zastosowaniem czujnika światłowodowego do detekcji przeciwciał w ściekach opublikowano w artykule [C].

Wkład doktoranta

Działanie opracowanych czujników światłowodowych przedstawiono na przykładzie wykrywania RNA wirusów. W pracy [A] zawarto opis detekcji RNA wirusów SARS-CoV-2, w pracy [B] przedstawiono realizację czujnika do detekcji RNA wirusa grypy typu A. W celu wykonania sensora czoło światłowodu zostało zmodyfikowane tworząc mikrosferę, która następnie została pokryta warstwą bioaktywną, do których selektywnie wiążą się cząsteczki RNA wybranego wirusa. Doktorant jest pierwszym autorem w publikacji [A, B], odpowiadał za projekt i konstrukcję czujnika. Wykonywał modyfikacje geometryczne czujnika, które następnie przekazywał do pokrycia warstwami w celu umożliwienia detekcji RNA wirusa. Był współodpowiedzialny za integrację sensorów z układem oraz kalibrację działania układu, jak również pomiary. Doktorant brał udział w pisaniu manuskryptu, wykonał analizę danych oraz był współautorem tekstu porównującego czujnik z innymi metodami oraz opracował wnioski. W pracy [A] jest autorem abstraktu, podrozdziału 2.2, rozdziału 3 i 5, a także współautorem rozdziału 1, 4 oraz podrozdziału 2.1. W pracy [B] jest autorem rozdziału 3, podrozdziału 2.2 oraz współautorem rozdziału 1, 4 i 5 oraz podrozdziału 2.1. Samodzielnie wykonał wszystkie ilustracje zawarte w manuskryptach [A, B].

Badania nad czujnikiem do detekcji przeciwciał IgG w ściekach przedstawione zostały w pracy [C]. Doktorant zaangażowany był w przeprowadzanie eksperymentów przy wykorzystaniu światłowodowego czujnika z mikrostrukturą. Był współwykonawcą pomiarów optycznych, które następnie przygotował do walidacji i dalszej analizy przy wykorzystaniu algorytmów uczenia maszynowego. Analiza wykazała możliwość implementacji optycznej metody w celu monitorowania zmian w ściekach w czasie rzeczywistym. Wkładem doktoranta w manuskrypt jest współautorstwo w pisaniu podrozdziału 2.2 oraz 3.3.

Aktualny stan wiedzy

Aktualnie złotym standardem do detekcji materiału genetycznego wirusów są testy bazujące na reakcji łańcuchowej polimeraza (PCR). Metoda PCR z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) charakteryzuje się wysoką czułością umożliwiając wykrywanie niskich stężeń RNA na poziomie 1 aM, jednak czas potrzebny na przeprowadzenie analizy wynosi zazwyczaj kilka godzin [33]. W przypadku monitorowania rozprzestrzeniania się ognisk wirusa, długi czas analizy może ograniczać przydatność

metody w warunkach wymagających szybkiego reagowania. Do monitoringu dynamicznie rozwijających się ognisk zakażeń wirusowych, czas uzyskania wyniku staje się kluczowym parametrem determinującym skuteczność działań epidemiologicznych. Przedstawiane czujniki światłowodowe oferują przewagę funkcjonalną, umożliwiając detekcję biomarkerów na przykładzie RNA wirusa w czasie nawet kilku sekund. Dodatkowym atutem czujników światłowodowych jest możliwość budowy rozproszonej sieci czujników [5,34]. Taka architektura może zostać zastosowana w systemach wczesnego ostrzegania, diagnostyce masowej oraz przy zdalnym monitoringu zdrowia publicznego.

Opracowane czujniki można porównywać z innymi rozwiązaniami w technice światłowodowej. W literaturze przedstawiono czujniki światłowodowe do detekcji biomarkerów, które różnią się wykrywanym biomarkerem (np. fragmentami RNA [A, B], białkami [35] czy metabolitami [36,37]). Biomarkery różnią się specyficznością diagnostyczną oraz momentem wystąpienia najwyższego stężenia. Dla przykładu biomarker CRP jest znacznikiem zapalenia, jest niespecyficznym biomarkerem, którego poziom wzrasta w przypadku infekcji, ale również podczas urazów, reakcji alergicznej czy wystąpienia nowotworów. Służy do oceny intensywności zdarzenia i kontrolowania postępów leczenia. Do specyficznych biomarkerów można zaliczyć IgG, jako znacznik odpowiedzi immunologicznej, oznacza to, że jego stężenie wzrasta podczas infekcji, alergii lub jako odpowiedź na szczepienie. Występowanie IgG świadczy o przebytych kontakcie z konkretnym patogenem. Kolejnym specyficznym biomarkerem jest RNA, za pomocą którego można wykryć wirusy, jego największą zaletą jest możliwość detekcji jeszcze przed wystąpieniem objawów choroby.

Czujniki światłowodowe różnią się wykorzystanym zjawiskiem działania (np. operują na zmianach współczynnika załamania [38], absorpcji, przesunięciach widma [39], fluorescencji [40] czy wzmocnieniu plazmonowym [41]). Istotne są również zastosowane typy włókna. Powszechnie stosuje się światłowody polimerowe oraz z krzemionki (włókna szklane). Kluczowymi różnicami pomiędzy materiałami do produkcji światłowodów jest zakres długości fal, na których operują, tłumienność, średnica rdzenia, elastyczność i wytrzymałość temperaturowa [42]. Włókna polimerowe cechują się najniższym tłumieniem w zakresie widzialnym o wartości rzędu setek dB/km, jest to wartość znacząco wyższa w porównaniu do światłowodów szklanych, których tłumienność spada poniżej 0,2 dB/km w oknach transmisyjnych w bliskiej podczerwieni [43]. Dlatego światłowody polimerowe stosuje się zazwyczaj w zastosowaniach krótkodystansowych, natomiast włókna szklane do transmisji sygnału na długi dystans. Warto wspomnieć, że włókna polimerowe cechują się wyższą aperturą numeryczną, przez co łatwiej je sprzęgnąć z układami optycznymi. Standardowo włókna polimerowe są wielomodowe i mają średnicę rdzenia zazwyczaj w rozmiarze rzędu od 250 μm do 1 mm, pozytywnie wpływa to na wytrzymałość i elastyczność. Dla porównania standardowe włókna szklane mają średnicę rzędu 8-10 μm dla światłowodów jednomodowych i 50-62,5 μm dla światłowodów wielomodowych [44]. Ostatnim istotnym parametrem do porównania jest odporność temperaturowa, włókna polimerowe w zależności od materiału mogą wytrzymać temperatury rzędu 200°C, natomiast włókna szklane, np. krzemionkowe mogą pracować nawet przy temperaturach powyżej 1000°C [45].

Warto też wspomnieć o możliwości wykonania modyfikacji geometrycznych w światłowodzie, które obejmują m.in. przewężki [46], wnęki w rdzeniach [47] czy mikrosfery [A, B]. Modyfikacje

umożliwiają wykorzystanie, np. powierzchniowego rezonansu plazmonowego albo zmniejszenie wpływu niepożądanych zjawisk. Zdecydowano się porównać czujniki za pomocą wartości granicy detekcji oraz czasu potrzebnego do analizy, przyjmując te wartości jako parametry krytyczne czujników. W tabeli 1 przedstawiono reprezentacyjne metody do detekcji biomarkerów.

Tabela 1. Porównanie wybranych metod detekcji biomarkerów, na przykładzie RNA i DNA

Metoda	Biomarker	Czas analizy	Limit detekcji	Ref.
Światłowodowy czujnik z mikrosferą	RNA	kilkanaście sekund	0,1 fM	Zaprezentowane czujniki
Światłowod z kryształami fotonicznymi	RNA	pomiar w czasie rzeczywistym	10 fM	[38]
Światłowodowy interferometr	DNA	30 sekund	1 nM	[39]
Światłowod z siatkami Bragga	DNA	kilkanaście sekund	1.87 nM	[48]
Światłowod z powierzchniowym rezonansem plazmonowym	Kwas nukleinowy	30 sekund	1 aM	[41]
Światłowodowy czujnik z przewężką	DNA	n.r.	0.1 fM	[46]
Elektrochemiczny	RNA	pomiar w czasie rzeczywistym	0.1 pM	[49]
RT-PCR	RNA	do kilku godzin	~ 1 aM	[50,51]

2.1 Projekt głowicy czujników światłowodowych oraz konstrukcja układu pomiarowego

Projektując czujnik światłowodowy należy uwzględnić cały system pomiarowy, który składa się ze źródła promieniowania optycznego, detektora, czujnika, niezbędnego osprzętu światłowodowego oraz badanego obiektu.

Do detekcji zmian wywołanych obecnością biomarkerów zdecydowano wykorzystać zjawisko interferencji. Interferometr można zbudować zarówno na światłowodzie jednomodowym, jak i wielomodowym. Konfiguracja jednomodowa cechuje się wyższą rozdzielczością spektralną, przez co widmo jest łatwiejsze w interpretacji, ze względu na wyraźne prążki interferencyjne. Interferometr zbudowany w konfiguracji ze światłowodem wielomodowym, może zapewniać wyższą moc sygnału.

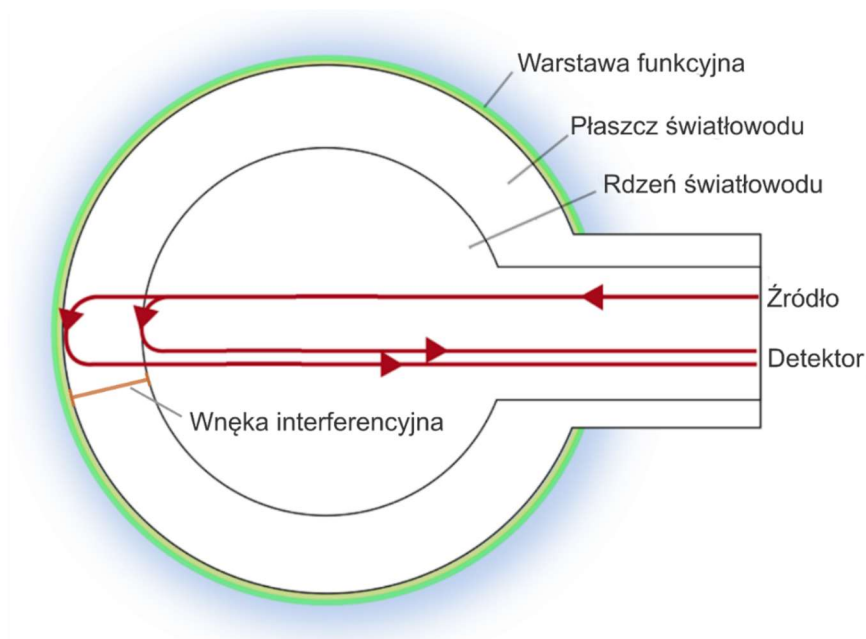
Biorąc pod uwagę analizę materiałów oraz chęć wykonania możliwie czułego sensora bazującego na zjawisku interferencji zdecydowano się na zastosowanie jednomodowego włókna szklanego. Wybór argumentuje się głównie ze względu na możliwe lepsze rozdzielczości spektralne,

niższe tłumienie, łatwiejszą dostępność włókien jednomodowych w przypadku szklanych światłowodów oraz potencjalną możliwość integracji czujników z istniejącymi systemami telekomunikacyjnymi. Wybrano światłowod SMF-28 cechujący się tłumiennością poniżej 0,32 dB/km dla długości fali 1310 nm oraz tłumiennością poniżej 0,18 dB/km dla długości fali 1550 nm [52]. Włókno szklane pokryte powłoką ochronną miało średnicę 250 μm , natomiast samo włókno szklane 125 μm .

Jako detektor zastosowano analizator widma optycznego (OSA) Ando AQ6319 od firmy Yokogawa o rozdzielczości długości fali w zakresie 0,02-2 nm, umożliwiający pomiar widmowy w zakresie 600-1700 nm. Szeroki zakres pracy oraz wysoka rozdzielczość pozwalają na zarejestrowanie do 50001 punktów próbkowania danych. Wybór OSA podyktowany był potrzebą pomiarów o możliwie wysokiej rozdzielczości, jest to najdroższy element układu.

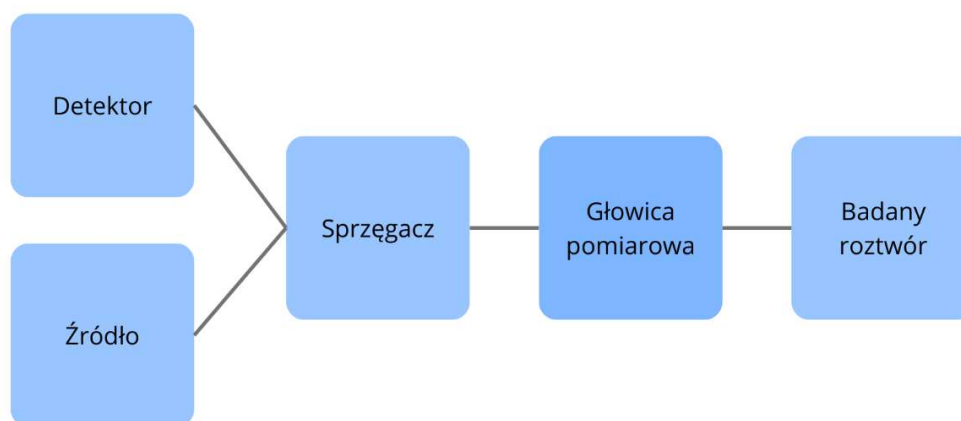
W kolejnym etapie podjęto decyzję o doborze źródła światła odpowiedniego do wymagań eksperymentu. Aby zaobserwować zjawisko interferencji, źródło promieniowania optycznego musi cechować się koherencją. Wysoką długość drogi koherencji zapewniają lasery, których wąskie widmo i stabilność fazowa czynią je odpowiednimi, natomiast cechują się bardzo wysoką wrażliwością na drgania i zmiany temperatury. Alternatywą dla laserów w układach z interferometrem są diody superluminescencyjne, emitujące szerokie widmo o znacznie krótszej długości drogi koherencji w porównaniu do lasera [53]. W praktyce oznacza to, że prążki interferencyjne są widoczne tylko przy małej różnicy dróg optycznych, co ogranicza wpływ niepożądanych odbić i zakłóceń. Z tego względu częściej znajdują zastosowanie m.in. w tomografii optycznej czy pomiarach tkanek biologicznych [54]. Zaprojektowany czujnik bazuje na zmianach w warstwie pokrywającej światłowod, dlatego optymalnym rozwiązaniem jest źródło niskokoherencyjne. Zdecydowano się na wybór diody superluminescencyjnej SLD-1310-18-W od firmy FiberLabs, której centralna długość fali wynosi 1310 nm, jest to wartość w oknie transmisyjnym wybranego światłowodu i standardem w telekomunikacji. Szerokość spektralna źródła wynosi 52 nm, a jego moc wyjściowa to 18 mW.

Wybrane źródło, detektor oraz światłowod połączono sprzęgaczem optycznym dzielącym moc wiązki w proporcji 50/50. Następnym krokiem było wykonanie głowicy sensora bazując na światłowodzie. Wykorzystano wcześniej zdobyte doświadczenie i zaproponowano wykonanie mikrosfery na końcu światłowodu, dzięki czemu wnęka interferometru ma stałą długość i znajduje się między rdzeniem, a czołem światłowodu sfunkcjonalizowanym do detekcji biomarkerów, jak przedstawiono na rysunku 1. Takie rozwiązanie eliminuje konieczność stosowania dodatkowego zwierciadła, dodatkowo zmniejsza wpływ drgań na układ oraz zwiększa powierzchnię czoła światłowodu, jest istotne w przypadku funkcjonalizacji czujnika.



Rysunek 1. Schemat głowicy światłowodowego czujnika z zaznaczeniem kluczowych wiązek dla zjawiska interferencji

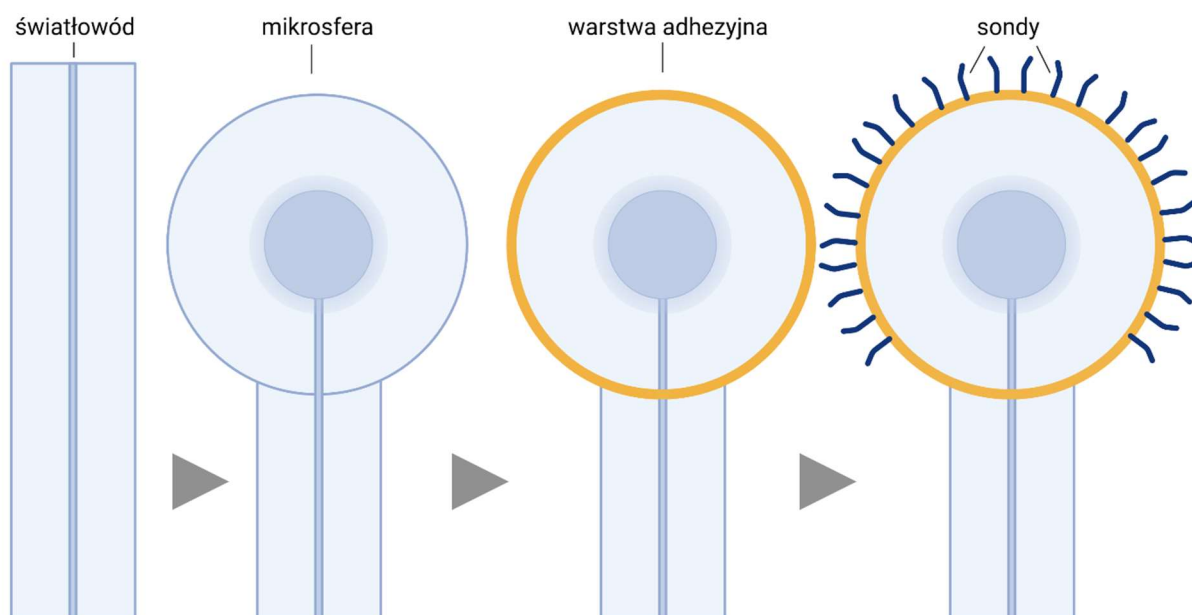
Wiązka odbita na granicy tworzonej przez rdzeń i płaszcz nie ulega zmianie, natomiast zmianie ulega wiązka odbita od granicy czoła światłowodu. Zmiany struktury warstwy pokrywającej światłowód spowodowane np. uszkodzeniem, temperaturą lub przyłączeniem cząsteczek będą zmieniać właściwości optyczne co przyczyni się do zmiany w rejestrowanym widmie interferencyjnym. Poprzez analizę zmian w widmie możliwe jest monitorowanie obecności biomarkerów w próbce. Schemat układu pomiarowego przedstawiono na rysunku 2, elementy składowe można w łatwy sposób zmieniać w celu dostrojenia układu do potrzeb.



Rysunek 2. Schemat układu pomiarowego z wykorzystaniem czujnika światłowodowego do badań biomarkerów

Realizację głowicy przedstawiono na rysunku 3. Mikrosfery na czole wybranego światłowodu wykonano o średnicy ok. 285 μm , wybrana średnica zapewnia odpowiednią widoczność prążków interferencyjnych w widmie dla długości fali 1330 nm. Do formowania zmian na czole światłowodu wykorzystano spawarkę światłowodową (FSU 975, Ericsson), której łuk elektryczny nadtapiał włókna

umożliwiając formowanie soczewki. Sterując mocą łuku, czasem działania oraz pozycją czoła względem łuku, można dostosowywać rozmiar powstałej struktury. Tak powstałą bazę dla głowicy można następnie sfunkcjonalizować do detekcji biomarkerów. Kolejnym krokiem jest nałożenie warstwy adhezyjnej dla warstwy biologicznej, np. złota, tak przygotowaną powierzchnię pokryto sondami do identyfikacji biomarkerów.



Rysunek 3. Schemat realizacji głowicy czujnika. Wykonanie mikrosfery na czole światłowodu, następnie przygotowanie warstwy adhezyjnej. Przyłączenie sond do identyfikacji biomarkerów

2.2 Światłowodowy czujnik do detekcji RNA wirusów

Opracowano projekt unikalnej konstrukcji światłowodowego interferometru, z uwzględnieniem wymagań detekcji RNA. Wybór biomarkera jakim jest RNA podyktowany jest jego zastosowaniem w diagnostyce infekcji wywołanych konkretnym patogenem, a jego główną zaletą jest występowanie w organizmie jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych [55]. Potrzeba opracowania nowych sensorów tego typu wynika z konieczności szybkiej i precyzyjnej diagnostyki pacjentów, zwłaszcza w celu prowadzenia nadzoru epidemiologicznego. Detekcja RNA wirusów umożliwia wczesne ostrzeganie o potencjalnych ogniskach zakażeń, jak również monitorowanie rozprzestrzeniania się patogenów.

Wykonane czujniki służą do wykrywania (1) RNA wirusów Sars-Cov-2, (2) RNA grypy typu A. Głowicą pomiarową pozostał jednodomowy światłowod, wykorzystywany w telekomunikacji. Na końcu czoła światłowodu wykonana została mikrosfera, na której następnie wykonano biofunkcjonalizację dostosowaną do detekcji konkretnego wirusa. Pierwszym krokiem było pokrycie głowicy cienką warstwą złota, zdecydowano się na warstwę 100 nm. Warstwa ta ułatwiła dalszą biofunkcjonalizację, zwiększając adhezję kolejnych warstw. Grubość została wybrana w sposób umożliwiający dalsze promieniowanie wiązki optycznej do kolejnych warstw. Złota warstwa została zmodyfikowana z wykorzystaniem Tris(2-karboksyetylo)fosfiny i agarozy w celu przyłączenia wcześniej przygotowanych sond oligonukleotydowych, selektywnych na konkretne wiązania fragmentów DNA lub RNA. Ostatnim

krokiem jest umieszczenie głowicy w roztworze 11-mercaptododekanolu w celu umożliwienia elastycznego ruchu sondom, poprawiając wydajność czujnika. Tak przygotowana głowica pomiarowa umożliwia selektywną detekcję RNA wirusów poprzez hybrydyzację do sondy na głowicy czujnika. Poprzez zmianę sond oligonukleotydowych można modyfikować metodę na wykrywanie innych patogenów.

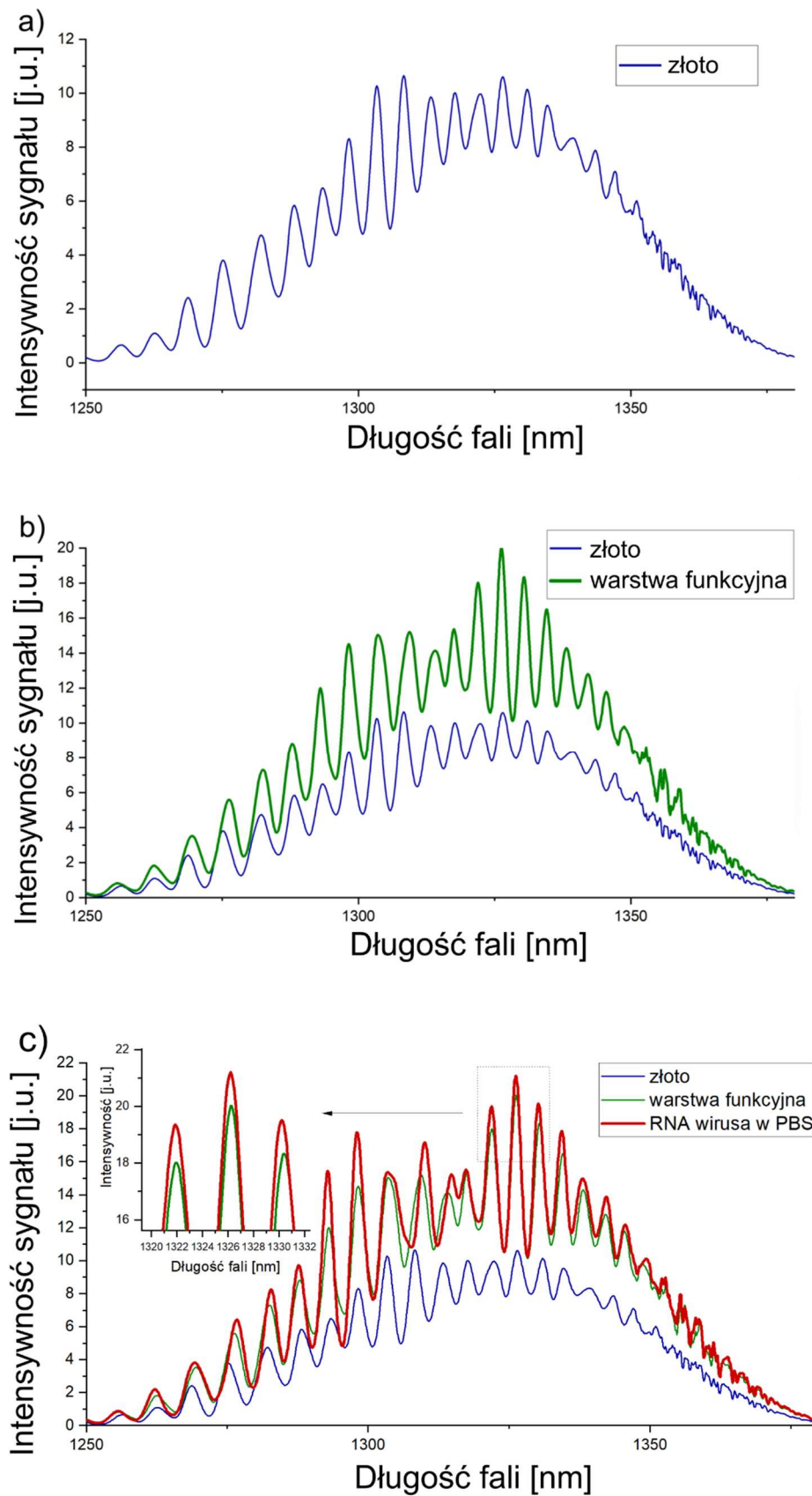
Warstwa złota została naniesiona metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej wykorzystując złoto o czystości 99.999% od firmy Kurt J.Lesker, USA. Następne warstwy nakładano poprzez zanurzenie czoła światłowodu w celu naniesienia sond oligonukleotydowych. Głowica pomiarowa była w tym czasie podłączona do analizatora, przez co możliwa była obserwacja zmian widma związanych ze zmianami na czole światłowodu. Rezultat zjawiska interferencji, można zaobserwować we wiązce propagowanej do odbiornika. Od różnicy faz wiązek zależy modulacja częstotliwość spektralnej rejestrowanego sygnału pomiarowego. Zarejestrowany rozkład widmowy mocy można opisać wzorem:

$$I_{out}(v) = S(v)[1 + V_0 \cos(\Delta\varphi(v))], \quad (1)$$

gdzie v jest częstotliwością, $S(v)$ jest rozkładem widma mocy źródła promieniowania, V_0 widoczność prążków (kontrast) sygnału pomiarowego, $\Delta\varphi$ opisuje różnice fazy wiązek, zależność tą można opisać wzorem:

$$\Delta\varphi(v) = \frac{4\pi R I v L}{c} = \frac{4\pi R I L}{\lambda}, \quad (2)$$

gdzie c jest prędkością światła w próżni, λ jest centralną długością fali źródła promieniowania, RI to współczynnik załamania wewnątrz wnęki interferencyjnej, a L to to długość wnęki interferometru. Zmiana współczynnika załamania światła, zmiany temperatury, czyli zmiany na powierzchni czujnika powodują modyfikację efektywnej drogi optycznej. Zmiany długości drogi optycznej powodują przesunięcie faz pomiędzy interferującymi wiązkami, co jest widoczne w rejestrowanym rozkładzie widmowym. W ten sposób dokonywano walidacji, że warstwa faktycznie została wykonana na światłowodzie (rys. 4).

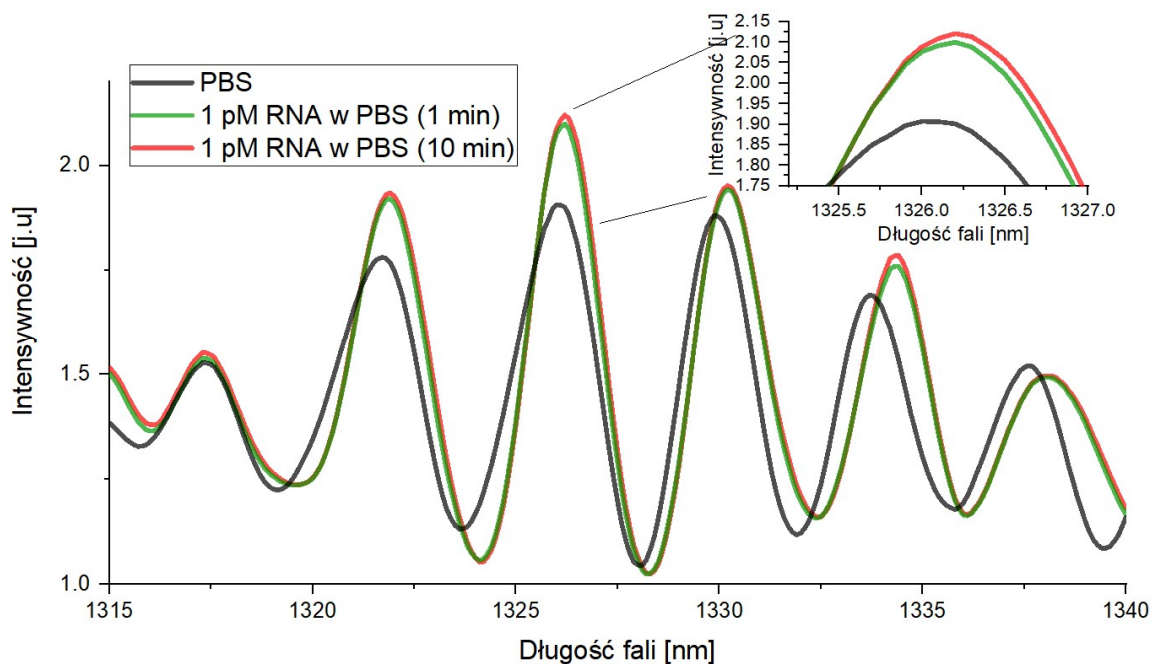


Rysunek 4. Zarejestrowane zmiany widma podczas nakładania kolejnych warstw na głowicę opracowanego czujnika światłowodowego, a) głowica pokryta złotem, b) głowica pokryta złotem oraz warstwą funkcyjną, c) głowica pomiarowa zanurzona w próbce zawierającej RNA wirusa w roztworze PBS.

Każda kolejna warstwa dołączona do czoła światłowodu powoduje zmiany właściwości optycznych, zmiany te można zaobserwować w widmie odbieranym z czujnika. Pierwsza zmiana jest związana z intensywnością rejestrowanego sygnału, spowodowane jest to rosnącą reflektancją spowodowaną akumulacją molekuł doczepionych do czoła światłowodu. Kolejną mniej dominującą zmianą jest przesunięcie widma sygnału. Przesunięcie to jest związane ze zmianą współczynnika załamania, powodowane m.in. poprzez przyłączenie RNA do warstwy na głowicy pomiarowej.

2.2.1 Detekcja RNA wirusa SARS-CoV-2

Pierwszy opracowany czujnik z warstwą do detekcji RNA SARS-CoV-2 został poddany badaniom, których celem było wykrycie RNA wirusa SARS-CoV-2 o stężeniu 1 pM w PBS. Jest to wartość RNA, którą można znaleźć w wymazie pacjenta. Pierwszy pomiar referencyjny został przeprowadzony w czystym PBS. Następne pomiary zostały przeprowadzane w przygotowanej próbce PBS zawierającej RNA w określonym stężeniu równym 1 pM. Głowica czujnika zanurzona była przez 10 minut. Już w pierwszej minucie zaobserwowano znaczącą zmianę widma, dynamika zmian w kolejnych 9 minutach była znacząco mniejsza. Oznacza to, że w ciągu pierwszej minuty doszło do większości łączy RNA z biofunkcjonalizowaną warstwą na powierzchni czujnika. Zarejestrowane widma przedstawiono na rysunku 5.



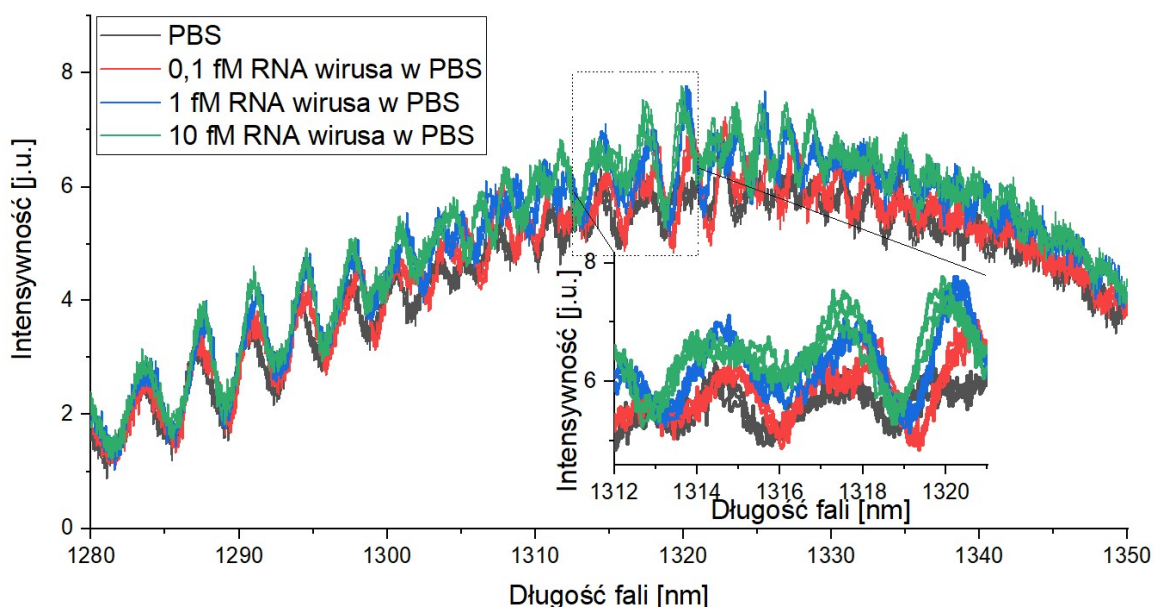
Rysunek 5. Zarejestrowane widmo rozprawy referencyjnego PBS oraz rozprawy pomiarowego z RNA wirusa w PBS. Pomiar zapisany po 1 minucie oraz 10 minutach zanurzenia głowicy w roztworze pomiarowym.

Detekcja RNA wirusa może odbywać się zarówno poprzez obserwację zmian intensywności rejestrowanego widma jak i przesunięcia jego maksimów lub minimów. Zaobserwowano, że dominującym efektem jest zmiana intensywności widma, co ułatwia jego interpretację, niż efekt przesunięcia położenia widma. Analiza widm wykazała wzrost intensywności o 10,2% na długości fali 1326nm dla pomiaru próbki zawierającej 1pM RNA w PBS po 1 minucie zanurzenia w stosunku

do pomiaru próbki referencyjnej, czyli czystego PBS. Dla pomiaru wykonanego po 10 minutach zanurzenia czujnika w roztworze pomiarowym stosunek intensywności na tej samej długości fali wzrósł o 11,3% w stosunku do pomiaru referencyjnego. Zarejestrowane przesunięcie widma wynosiło 0,2 nm dla obu czasów pomiarowych. Zarejestrowane zmiany optyczne potwierdzają działanie czujnika oraz potwierdzają występowanie specyficznych interakcji zachodzących na powierzchni sensora. Szybkość odpowiedzi czujnika otwiera możliwość potencjalnego zastosowania w systemach detekcji w czasie rzeczywistym. W przypadku pomiarów dla stężenia 1 pM RNA wirusa zarejestrowano wyraźne zmiany intensywności sygnału, co sugeruje, że czujnik umożliwia zarówno detekcję niższych stężeń jak i ilościową analizę próbki.

2.2.2 Detekcja RNA wirusa grypy typu A

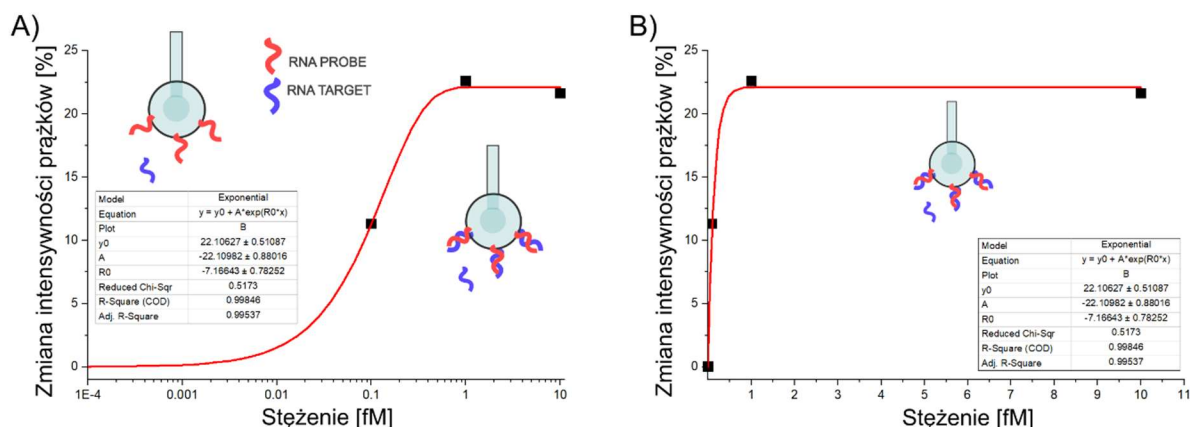
Po pozytywnych testach czujnika i walidacji poprawności działania metody na podstawie detekcji RNA SARS-CoV-2 przystąpiono do pracy nad kolejnym czujnikiem. Opracowano czujnik do detekcji RNA grypy typu A. Poprzednie wyniki wskazywały, że detekcja niższych stężeń niż 1 pM powinna być możliwa. Dlatego tym razem przygotowano próbki o niższych stężeniach, najniższe testowane stężenie wynosiło 0,1 fM. Jako biomarker posłużył fragment DNA imitujący sekwencje RNA grypy typu A. Skrócono również czas pomiarowy z 10 minut do 4,5 minuty. Zarejestrowano widma dla 4 stężeń w zakresie 0,1 fM do 10 fM DNA w PBS, surowe dane przedstawiono na rysunku 6. Można zaobserwować, że głównie widoczna jest zmiana intensywności widma. Na tej podstawie została przeprowadzona dalsza analiza mająca na celu określanie stężenia w próbce.



Rysunek 6. Zarejestrowane widma roztworu referencyjnego PBS zaznaczonego na czarno oraz trzech stężeń DNA imitującego RNA wirusa w PBS

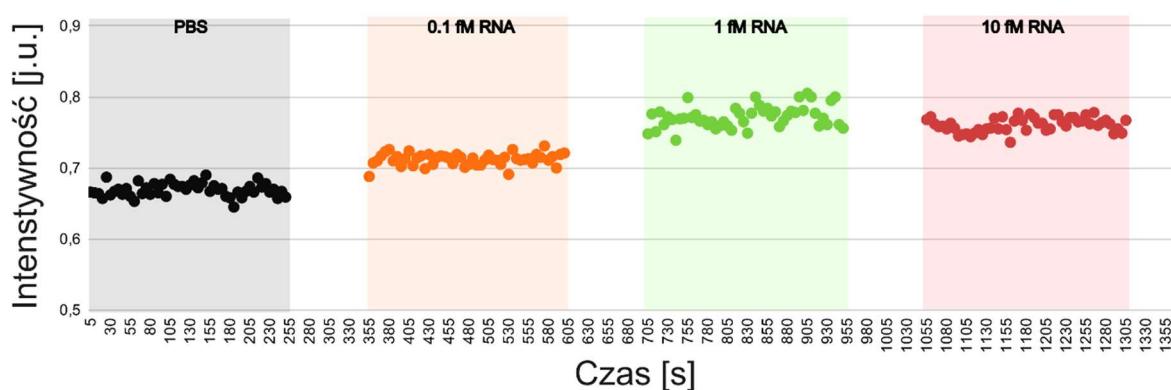
Analizę przeprowadzono obserwując zmiany intensywności prążków najbliższych wartości 1320 nm i 1298 nm między pomiarem referencyjnym PBS, a pomiarem właściwym. Przeprowadzono

badania nad czujnikiem analizując zmiany intensywności widma w funkcji stężenia RNA wirusa grypy. Zależność zmian intensywności prążków od stężenia analizowanego biomarkera opisano za pomocą dopasowania funkcji wykładniczej do zebranych punktów pomiarowych, wyniki przedstawiono na rysunku 7. Zaobserwowano, że dla najniższego stężenia 0,1 fM, zmiana intensywności zarejestrowanego sygnału wynosi 11,29%. Natomiast przy wartości 1 fM dochodzi już do przesycenia czujnika. Pomiar dla stężenia 0 nie jest możliwy do przedstawienia w skali logarytmicznej, dlatego zdecydowano się zastosować logarytmiczną oraz liniową skalę stężenia na oddzielnych wykresach. Skala pionowa pozostaje liniowa, wykorzystano tą samą funkcję aproksymującą.



Rysunek 7. Zmiana intensywności widma w funkcji stężenia badanego RNA. A) reprezentacja stężeń w skali logarytmicznej, do aproksymacji krzywej nasycenia, B) reprezentacja stężeń w skali liniowej

Następnie przetestowano charakterystyki czujnika w funkcji czasu (rysunek 8). Zbadano zmianę intensywności maksymalnej wartości intensywności w widmie, czyli wartości w okolicy 1320 nm w czasie. Pomiaru dokonywano w interwale 5 sekund. Pomiaru przeprowadzono od najniższego stężenia do najwyższego. Wyniki wskazują na stabilność czujnika podczas pomiarów.



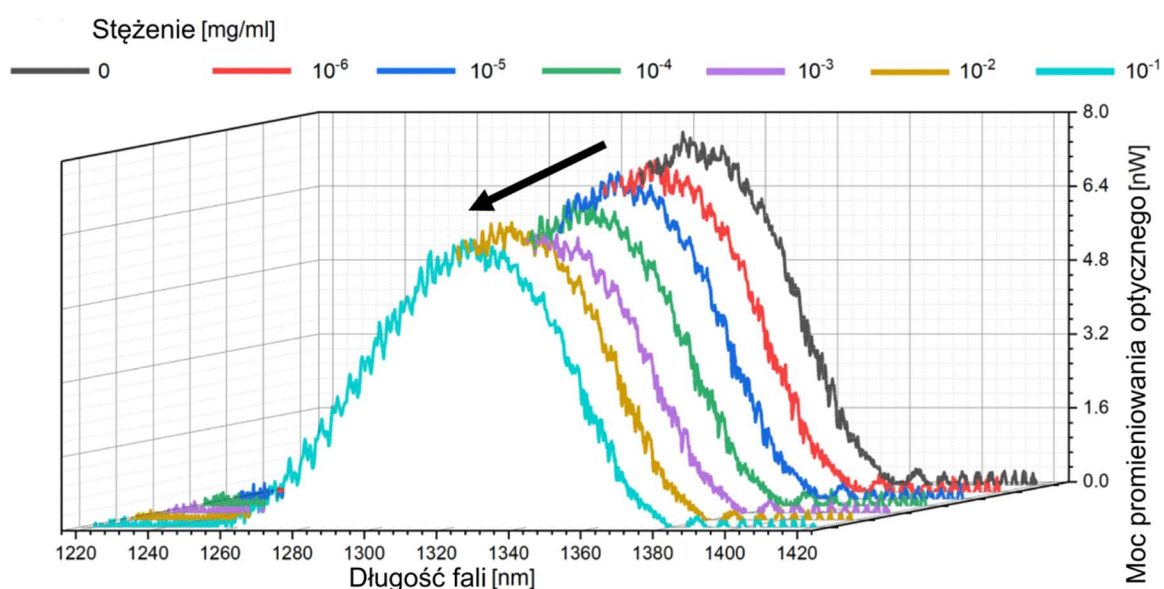
Rysunek 8. Zmiana intensywności widma w funkcji czasu. Kolorem czarnym pomiary referencyjny, następnie na pomarańczowo stężenie 0,1 fM DNA w PBS, na zielono stężenie 1 fM, a czerwono 10 fM

2.3 Światłowodowy czujnik do detekcji białka IgG

Zrealizowano trzeci czujnik bazujący na światłowodzie. Czujnik miał umożliwić zdalny nadzór nad zmianami w ściekach w celu wykrywania przeciwciał wirusów, aby przewidzieć potencjalne wystąpienia ognisk infekcji. Jako biomarker wybrane zostało białko immunoglobiny G, które jest rodzajem przeciwciała. Jego stężenie w organizmie rośnie w odpowiedzi na infekcję, jak również podczas odpowiedzi układu odpornościowego na przyjęcie szczepionki. Przeciwciała mogą przedostawać się do ścieków wraz z płynami ustrojowymi [56].

Głowica pomiarowa została zrealizowana poprzez pokrycie wcześniej opisanej mikrosfery, takiej samej jak dla czujników do detekcji RNA wirusów, zmianie uległa biofunkcjonalizowana warstwa pokrywająca mikrosferę. Tak wykonany czujnik umożliwia selektywną detekcję przeciwciał immunoglobiny IgG. Do szklanej powierzchni mikrosfery został przymocowane grupy aminowe, do których następnie przyłączono biotynę, tak przygotowany światłowod następnie zanurzono w roztworze zawierającym białka S1 wirusa SARS-CoV-2 z awidyną. Zakończony światłowod z mikrosferą pokrytą biotyną tworzy silne wiązania z awidyną. Tak przygotowana głowica umożliwia następnie przyłączenie przeciwciał (białka IgG) do białek S1 wirusa. Spowoduje to zmiany w biofunkcjonalizowanej warstwie, co objawi się zmianami w rejestrowanym widmie optycznym. Przyłączone przeciwciała można rozłączyć poprzez przepłukanie głowicy w roztworze PBS, umożliwia to wielokrotne wykorzystanie głowicy pomiarowej.

Do pomiarów przygotowano roztwory zawierające stężenia przeciwciał (białka IgG) w zakresie od 10^{-6} mg/ml do 10^{-1} mg/ml w ściekach. Każde stężenie zostało zmierzone 10 krotnie, przed każdym pomiarem głowica była płukana w roztworze PBS w celu oczyszczenia powierzchni głowicy. Zarejestrowane widma przedstawiono na rys 9.



Rysunek 9. Widma optyczne zarejestrowane dla różnych stężeń przeciwciał w ściekach. Wykres wykonany przez dr. inż. Monikę Kosowską

Wraz ze wzrostem stężenia maleje intensywność rejestrowanego sygnału. Spowodowane jest to zmianą absorpcji lub rozpraszaniem warstwy bioaktywnej po przyłączeniu do niej przeciwciał. Przeprowadzona wstępna analiza potwierdziła działanie układu i samej głowicy sensora. Zabrane dane pomiarowe następnie posłużyły do analizy z wykorzystaniem algorytmów uczenia maszynowego, które na podstawie analizy kształtu widma z dokładnością do 94% określają czy stężenie przeciwciał przekroczyło wartość 10^{-4} mg/ml. Wartość ta może być zmieniana według potrzeb na podstawie obserwacji średnich stężeń w ściekach.

Osiągnięcia przedstawione w rozdziale 2 dotyczą opracowania i realizacji nowych czujników światłowodowych do zastosowań biomedycznych. Otrzymane wyniki dowodzą założonej tezie, że za pomocą czujnika światłowodowego zbudowanego z wykorzystaniem telekomunikacyjnego światłowodu jednomodowego można efektywnie wykrywać wybrany biomarker w złożonej matrycy biologicznej. Zrealizowano układy pomiarowe do monitorowania zmian stężenia biomarkerów w płynnych próbkach. Zaprezentowano trzy głowice pomiarowe, które zostały pokryte biofunkcjonalizowanymi warstwami umożliwiającą selektywną detekcję immunoglobiny G lub RNA wirusa na przykładzie SARS-CoV-2 i grypy typu A. Parametry techniczne zaprezentowano w tabeli 2.

Tabela 2. Wybrane parametry techniczne zrealizowanych czujników światłowodowych

	Czujnik SARS-CoV-2	Czujnik grypa typu A	Czujnik immunoglobiny G
Typ światłowodu	Szklany jednomodowy (SMF-28)	Szklany jednomodowy (SMF-28)	Szklany jednomodowy (SMF-28)
Długość fali roboczej	1310 nm	1310 nm	1310 nm
Zasada detekcji	Zmiany widma interferencyjnego	Zmiany widma interferencyjnego	Zmiany widma interferencyjnego
Biomarker docelowy	RNA wirusa SARS-CoV-2	DNA imitujące RNA wirusa grypy typu A	Przeciwciała IgG
Warstwa funkcjonalna	Złoto + sondy oligonukleotydowe	Złoto + sondy oligonukleotydowe	APTES + biotin + avidin + sonda s1
Zakres optyczny	Zmiana z 0 do 1pM to zmiana o intensywności o 10,2% i przesunięcie widma o 0,2 nm	Zmiana z 0 do 0.1fM to zmiana intensywności o 11,29%	Zmiana z 0 do 0,1 mg/mL to zmiana intensywności o 8,9%
Limit detekcji	1 pM	0,1 fM	10^{-6} mg/mL
Czas odpowiedzi	1 minuta	<1 minuty	< 5 minut

Czujnik na przeciwciała IgG umożliwia monitorowanie dynamiki zmiany stężenia w zakresie stężeń do 10^{-6} mg/ml do 10^{-1} mg/ml. Potwierdzono możliwość wielokrotnego użycia czujnika dzięki procedurze czyszczenia powierzchni w roztworze PBS. Zrealizowany sensor można zintegrować z

algorytmami uczenia maszynowego w celu stworzenia systemu do wczesnego ostrzegania o przekroczeniu stężenia, do zastosowań środowiskowych. Kolejny czujnik z selektywną warstwą na RNA wirusów, został zwalidowany na przykładzie wirusa SARS-CoV-2. Umożliwił detekcję 1 pM RNA wirusa na podstawie zarejestrowanych zmian widma po 1 minucie ekspozycji głowicy w próbce. Potwierdziło to możliwość wykrywania klinicznych stężeń RNA oraz potencjał do ilościowej analizy. Kolejny wykonany czujnik umożliwił detekcję RNA wirusa grypy typu A w stężeniu 0,1 fM. W porównaniu do złotego standardu diagnostycznego opracowane czujniki zapewniają znacznie krótszy czas uzyskania wyniku, co zwiększa ich przydatność w systemach nadzoru epidemiologicznego. Rozwinięcie technologii czujników światłowodowych umożliwi budowę rozproszonych sieci czujników do monitorowania zagrożeń wirusowych w czasie rzeczywistym. Wdrożenie takiego rozwiązania na dużą skalę może wiązać się z wyzwaniami, takimi jak degradacja warstwy aktywnej pod wpływem czynników środowiskowych, m.in. promieniowania UV, oraz konieczność okresowej wymiany czujników ze względu na mutacje genomów wirusowych. Z tych względów przyszły rozwój prezentowanych czujników powinien obejmować prace nad stabilnością i powtarzalnością działania czujników w warunkach rzeczywistych.

3. Wykorzystanie spektroskopii absorpcyjnej w analizie złożonych płynnych matryc biologicznych

W rozdziale przedstawiono badania właściwości płynnych materiałów biologicznych za pomocą metod optycznych. Jako pierwsze medium do badań wybrany został mocz. Na podstawie spektroskopii absorpcyjnej opracowano metodę analizy zmian w moczu związanych ze stanami uroseptycznymi. Wyniki badań opublikowano w artykule [D], w którym zawarto klasyfikację zmian w moczu spowodowane przez zakażenie układu moczowego oraz stany urosepsy przy wykorzystaniu metod optycznych.

Wkład doktoranta

W pracy [D] poświęconej klasyfikacji próbek moczu od pacjentów z sepsą i zakażeniem układu moczowego przy wykorzystaniu metody optycznej doktorant jest drugim autorem. Wkładem doktoranta jest współpracowanie przy opracowaniu metodologii i zaplanowaniu procedur pomiarowych, przeprowadzenie pomiarów spektroskopowych oraz wykonanie wstępnej analizy danych i przygotowanie danych do dalszej analizy przy wykorzystaniu algorytmów uczenia maszynowego. Doktorant brał również udział w pisaniu manuskryptu: jest autorem podrozdziału 2.2, 2.3 oraz grafiki 1, 2 oraz wykresu 4, a także współautorem rozdziału 4. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów przeprowadzona została klasyfikacja pacjentów przy wykorzystaniu uczenia maszynowego wykonana przez mgr. inż. Kacpra Cierpiaka.

Aktualny stan wiedzy

Jednym z problemów klinicznych obarczonych wysoką śmiertelnością pozostaje sepsa, gwałtowna reakcja organizmu na infekcję, prowadząca do niewydolności narządowej [57]. Pomimo postępu w terapii, skuteczność leczenia sepsy w dużym stopniu zależy od czasu rozpoznania i wdrożenia kierunkowego leczenia, co czyni szybką diagnostykę kluczową [58,59]. Szacuje się, że w przypadku pacjentów z urosepsą każda godzina opóźnienia we wdrożeniu antybiotykoterapii prowadzi do spadku wskaźnika przeżywalności o 7,6% [60]. Podkreśla to kluczowe znaczenie szybkiej diagnostyki oraz natychmiastowego rozpoczęcia leczenia w przypadku wystąpienia stanów septycznych. Urosepsa jest kolejnym stadium zakażenia układu moczowego, w którym dochodzi do odpowiedzi zapalnej w całym organizmie [61]. Opracowana metoda pomiarowa zaprezentowana w poniższym rozdziale pozwala na rejestrację subtelnych zmian związanych z obecnością metabolitów i białek wydzielanych przez bakterie *Escherichia coli*, głównej przyczynie rozwinięcia urosepsy wśród pacjentów z zakażeniem układu moczowego (ZUM) [62]. Co istotne, to rodzaj szczepu bakterii wpływa na ryzyko dalszego rozwój zakażenia w kierunku urosepsy.

Spektroskopia UV–VIS jest szeroko wykorzystywaną metodą do określenia ilościowego i identyfikacji związków na podstawie ich charakterystyki absorpcji promieniowania [63]. Wykorzystanie spektroskopii absorpcyjnej w badaniach próbek biologicznych wiąże się z szeregiem istotnych zalet. Jedną z kluczowych cech jest krótki czas analizy. Pomiary mogą być wykonywane w czasie bliskim rzeczywistemu (w kilka sekund). Takie właściwości czynią spektroskopię absorpcyjną metodą

prawidłową do integracji w systemach monitorujących dynamiczne zmiany parametrów biologicznych u pacjentów w warunkach klinicznych [64], jak również w środowisku [65]. Obserwacja zmiany intensywności rejestrowanego promieniowania może również służyć do pomiaru stężeń badanych związków w próbkach biologicznych. Metoda umożliwia identyfikację obecności wybranych substancji na podstawie obserwacji zmian widma bez konieczności stosowania znaczników chemicznych, co dodatkowo obniża koszty pomiarów. Przykładowo w literaturze zaraportowano identyfikacji biomarkerów w moczu na przykładzie albuminy i kreatyniny, jako metoda wczesnego diagnozowania cukrzycowej choroby nerek [66]. Niestety, taka identyfikacja jest trudna w realizacji w przypadku próbek biologicznych, ze względu na złożoność matrycy. Próbkę te zawierają różnorodne cząstki, które mogą absorbować światło w tym samym zakresie, co doprowadza do pokrywania się wielu pików absorpcyjności. Z praktycznego punktu widzenia zaletą metody spektroskopowej jest możliwość miniaturyzacji układu oraz niewielka objętość próbki wymagana do pomiaru rzędu od kilku mikrolitrów do kilku mililitrów, co jest istotne w przypadku pracy z materiałem o ograniczonej dostępności.

Zaproponowaną w rozprawie metodę wykorzystującą spektroskopię absorpcyjną, porównano w tabeli 3 z wybranymi metodami do diagnozy wystąpienia sepsy u pacjenta. Biomarkery takie jak prokalcytonina (PCT) i białko C-reaktywne (CRP) wykorzystuje się jako narzędzia diagnostyczne na wczesnym etapie oceny pacjenta [67]. Pozwalają one w ciągu pierwszej godziny ocenić prawdopodobieństwo sepsy. Stężenie CRP wzrasta przy stanie zapalnym u pacjenta, ale ze względu na nieswoistość wyniku nie można przesądzić o wystąpieniu sepsy bez dalszej oceny klinicznej [68]. PCT jest bardziej specyficzna dla zakażenia bakteryjnego [69], a wysokie stężenie koreluje z ciężką infekcją, a trend spadkowy świadczy o skuteczności terapii.

Tabela 3. Porównanie wybranych parametrów metod diagnostyki wystąpienia sepsy

Metoda	Koszt wykonania analizy	Czas analizy	Czułość	Wymagania	Ref.
Spektroskopia absorpcyjna	Niski koszt pojedynczego testu	Kilka sekund	Średnia	Niskie wymagania przeszkolenia personelu. Wymagana znajomość obsługi analizatora.	[D]
Test ELISA	Test za kilkadziesiąt złotych	Wynik do 5h	Bardzo wysoka	Średnie wymagania przeszkolonego personelu. Wymagane procedury. Wyższy udział czynnika ludzkiego niż przy automatycznych testach.	[70,71]
Przesiew krwi	Koszt od kilkudziesięciu do tysiąca złotych, zależy od liczby wymaganych przesiewów	Kilka dni	Ujawnia patogeny tylko u 30-50% pacjentów z sepsą	Wysokie wymagania przeszkolonego personelu do poboru krwi oraz dalszej diagnozy laboratoryjnej.	[72]

Testy PCR	Test za kilkaset złotych	Wynik w ciągu 2 godzin	Wysoka czułość, wykrycie nawet po antybiotykach	Wymaga wykwalifikowanego personelu.	[50]
Oznaczenie CRP	Test za kilkadziesiąt złotych	Kilka minut	Wysoka czułość na proces zapalny, również na urazy. Wzrost zaczyna się ok 6-8h od zakażenia i uzyskuje szczyt po 1-2 dobach	Niskie wymagane przeszkolenie.	[68]
Oznaczenie PCT	Test za kilkaset złotych	Wynik w kilkanaście minut	Wysoka czułość na infekcje bakteryjne. Wzrost zaczyna się ok 3-6h od momentu zakażenia	Wymagane odczynniki, które znacząco wpływają na koszt. Obsługa analizatora lub testu kasetkowego. Nie wymaga zaawansowanej wiedzy.	[68,73]

Wymienione metody nie identyfikują bezpośrednio patogenu. Do potwierdzenia przyczyny wystąpienia sepsy jako złoty standard wykorzystuje się posiew krwi, ponieważ może dostarczyć dowód zakażenia poprzez wyizolowanie konkretnego drobnoustroju [72]. W wyniku posiewu dobierany jest również właściwy antybiotyk. Zasadniczym ograniczeniem posiewu krwi jest długi czas analizy, nawet kilkadziesiąt godzin. Obecnie na popularności zyskują testy PCR, które pozwalają na identyfikację patogenu już w 1-2 godziny. Zaletą jest możliwość wykrycia wielu patogenów równocześnie [50]. Wynik testu PCR nie zależy od żywotności bakterii, wykrywa DNA nawet po rozpoczęciu antybiotykoterapii. W ostatnich latach na popularności zyskują testy immunoenzymatyczne ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), które umożliwiają wykrywanie specyficznych markerów stanu zapalnego jak IL-6 oraz lipopolisacharydy bakterii gram-ujemnych [74,75], jakimi są bakterie z rodziny *Escherichia coli*. Testy pozwalają na stosunkowo szybkie oznaczanie biomarkerów, wynik zazwyczaj w ciągu 4-5 godzin dla dostępnych na rynku testów [71]. Wadą może być potrzeba odpowiednio przeszkolonego personelu i przestrzeganie procedur, ponieważ błędy techniczne i nieprawidłowe obchodzenie się z próbkami powodują fałszywe wyniki.

W odpowiedzi na wspomniane zapotrzebowanie szybkich metod diagnostycznych oraz ograniczenia obecnie stosowanych metod, w niniejszej pracy zaproponowano zastosowanie metod optycznych wspieranych przez algorytmy uczenia maszynowego, które umożliwiają szybką klasyfikację zagrożenia wystąpienia stanów septycznych na podstawie analizy widm absorpcyjnych moczu.

3.1 Implementacja pomiarów absorpcyjnych w analizie zmian parametrów moczu

Współczesna diagnostyka laboratoryjna wykorzystuje analizę moczu do rutynowego badania ogólnego, pozwalającego na ocenę pracy nerek, obecność białka, krwi, glukozy oraz zaawansowane testy służące identyfikacji patogenów [76]. Celem prezentowanej metody optycznej jest wsparcie procesu diagnostycznego poprzez szybką analizę optyczną próbek moczu. Zastosowanie techniki spektroskopii umożliwia różnicowanie pomiędzy zakażeniem układu moczowego, a stanami zagrażającymi rozwojem urospeszy.

W poniższym rozdziale zaprezentowano implementację spektroskopii absorpcyjnej, jednej z fundamentalnych metod do analizy optycznej. Do badań wykorzystany został spektrofotometr NanoDrop One C (Thermfisher Scientific, USA). Urządzenie jako wynik przedstawia widmo w zakresie UV–VIS, które przedstawia absorbancję, czyli zależność intensywności promieniowania przechodzącego przez próbkę do intensywności promieniowania, które na nią pada. Na podstawie absorbancji w funkcji długości fali możliwa jest ocena obecności jak i ilości badanej substancji. Opisuje to prawo Lamberta-Beera, według którego absorbancja roztworu jest wprost proporcjonalna do stężenia cząstek absorbujących w roztworze oraz długości drogi optycznej:

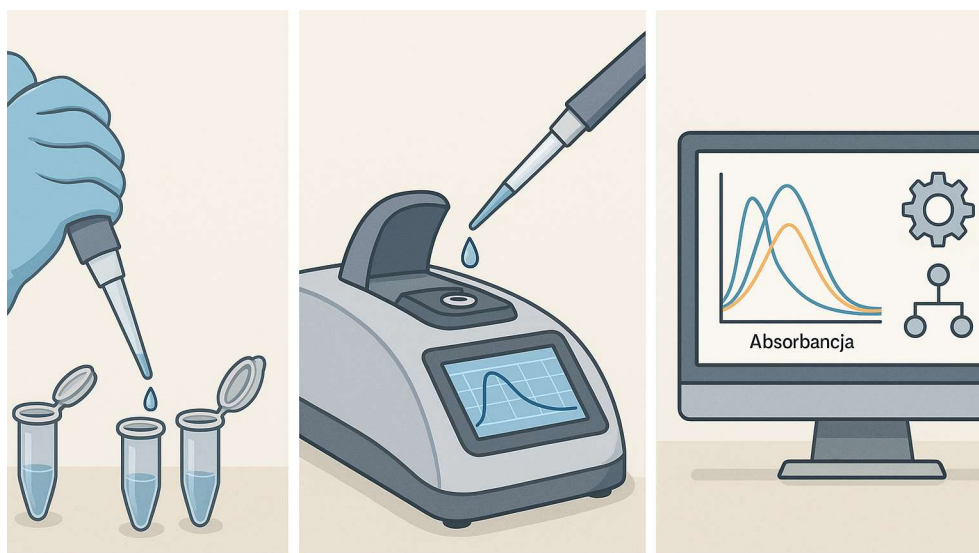
$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = kcl, \quad (3)$$

gdzie, I_0 – natężenie promieniowania padającego na próbkę, I – natężenie promieniowania propagującego przez próbkę, A – absorbancja, k – współczynnik pochłaniania promieniowania, nazywany również współczynnikiem absorpcji, c to stężenie, a l to długość drogi optycznej.

Długość drogi optycznej jest automatycznie dobierana przez urządzenie, czym niższe stężenie tym dłuższa długość drogi w celu zoptymalizowania dokładności pomiaru. Jako źródło w urządzeniu wykorzystano lampę ksenonową, generującą promieniowanie o szerokim spektrum, pokrywającym zakres pracy rządzenia 190–850 nm. Matryca CMOS zbudowana z 2048 elementów służy jako detektor, cechuje się on dokładnością pomiaru absorbancji na poziomie 3% dla 0,97 A i 302 nm. Powtarzalność pomiarów typowo wynosi 0,002 A.

3.2 Optyczna metoda klasyfikacji zagrożenia urosepsą

Za pomocą opracowanej metoda spektroskopowej klasyfikacji próbek moczu zbadano próbki od pacjentów wcześniej przetestowane laboratoryjnie. Próbkę moczu pochodziły od 241 pacjentów i zostały pozyskane od Gdańskiego Centrum Klinicznego. U 155 pacjentów zarejestrowano zmiany urosepsowe, objawiające się dodatnim wynikiem przesiewu krwi i moczu na obecność bakterii z rodziny *Escherichia coli*. Natomiast u pozostałych 86 pacjentów potwierdzono zakażenie układu moczowego bez urosepsy (negatywny przesiew krwi). Badania podzielono na 3 kroki: przygotowanie próbek, pomiary, klasyfikacja (rys.10).



Pobór próbek

Pomiary spektroskopowe

Klasyfikacja

Rysunek 10. Schemat kroków metody pomiarowej w celu klasyfikacji próbek

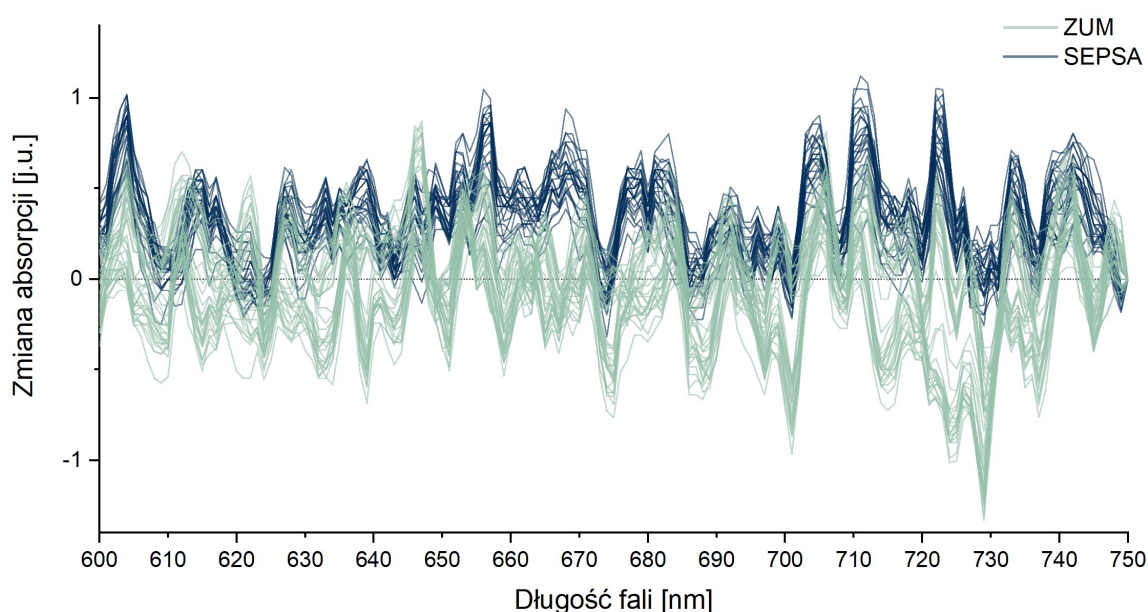
W pierwszym kroku pobrano próbki moczu od pacjenta oraz przydzielono indeks umożliwiający późniejsze sprawdzenie informacji o pacjencie związanych z zakażeniem układu moczowego. Następnie z moczu pacjentów zaszczerpiono roztwory sztucznego moczu umożliwiający rozwój bakterii. W tak przygotowanych roztworach hodowano bakterie w kontrolowanych warunkach. Przed właściwymi pomiarami spektroskopowymi każdą próbkę poddano inkubacji w celu zapewnienia odpowiedniego stężenia bakterii w próbce. Ilość bakterii była szacowana na podstawie wskaźnika gęstości optycznej (OD), która określana jest z przybliżeniem na podstawie widma absorpcyjnego na długości fali 600 nm. W oparciu o parametr OD szacuje się stosunek ilości komórek do objętości próbki. Ze względu na czułość metody do następnych kroków wzięto próbki z OD na poziomie wyższym niż 0,2. Z tych próbek odseparowano supernatant, który poddano pomiarom właściwym w celu detekcji zmian do dyskryminacji próbek na pochodzące od pacjenta z zakażeniem lub urosepsą.

Opracowana metoda oparta jest na analizie metabolitów, a nie bezpośrednio analizie moczu pacjenta. Separacja supernatantu pozwoliła uniknąć bezpośredniego wpływu bakterii i innych cząstek stałych rozpraszających na pomiar widma absorpcyjnego. Zarówno do pomiarów właściwych jak i określenia współczynnika OD wykorzystano spektrofotometr One Drop 2000 od firmy ThermoFisher. Wykorzystane urządzenie rejestruje widmo w zakresie 190 nm do 840 nm z krokiem co 1 nm. Jako detektor urządzenie wykorzystuje 2048 elementową linijkę CCD wykonaną na krzemie. Lampę ksenonową jako źródło o szerokim widmie. Urządzenie wymaga niewielkiej objętości próbki, do badań wykorzystywano po 2 μ l. Droga optyczna jest regulowana podczas pomiarów automatycznie i mieści się w zakresie od 0,05 do 1 mm.

Do analizy ograniczono zakres widmowy do regionu 600-750 nm. Wybór tego zakresu wynika z jego praktyczności w kwestii dostępności zarówno źródeł promieniowania jak i detektorów o niskim koszcie, co wpływa na potencjalną uniwersalność. Dodatkowo zwężenie zakresu przyczyni

się do skrócenia czasu analizy, co jest istotne przy zastosowaniu metod z wykorzystaniem uczenia maszynowego.

Na rysunku 11 przedstawiono porównanie widm absorpcji dla próbek pobranych od pacjentów z ZUM oraz urosepsą. Chociaż różnice są subtelne, to można zaobserwować tendencję do wyższych wartości absorpcji w przypadku próbek od pacjentów z urosepsą. Istotne zmiany można również zaobserwować np. na długości fali 620 nm. Zmiany w widmie spowodowane są obecnością metabolitów i białek wydzielanych przez bakterie *Escherichia coli*. Szczepy bakterii różnią się pod względem genetycznym, ale również metabolicznym. Nie każdy szczep jest uropatogenny. Metoda bazuje na zmianach powiązanych z patogennymi szczepami, które mogą wywołać urosepsę. Wstępna analiza potwierdziła możliwość rozróżnienia obu grup, jednak ze względu na niewielką skalę zmian oraz trudność jednoznacznej klasyfikacji danych spektralnych, zdecydowano się na zastosowanie dedykowanych algorytmów uczenia maszynowego. Ich wykorzystanie umożliwia identyfikację nieliniowych zależności i wzorów, co przełoży się na poprawę skuteczności klasyfikacji.



Rysunek 11. Zarejestrowane zmiany absorpcji względem wody, dla próbek od pacjentów z ZUM oraz urosepsą

Zarejestrowane widma zostały podzielone na zestawy trenujące i walidujące. Do zestawu trenującego wylosowano 2/3 widm, natomiast do zestawu walidującego 1/3. Najlepsze rezultaty uzyskane zostały po zastosowaniu algorytmu drzewa decyzyjnego osiągając na badanym zestawie dokładność klasyfikacji na poziomie 97% na próbki od pacjentów z zakażeniem układu moczowego oraz pochodzące od pacjentów, u których wystąpiła urosepsa. Najważniejszymi parametrami dla algorytmu były powierzchnia pod widmem absorpcyjnym oraz wariancja zarejestrowanego sygnału. Dzięki zastosowaniu algorytmów uczenia maszynowego możliwa jest automatyzacja procesu klasyfikacji oraz możliwość adaptacji do różnych warunków środowiskowych próbek.

Podsumowując, w powyższym rozdziale zaprezentowano metodę spektroskopową do pomiarów w płynnych, złożonych biologicznie materiałach. Wyjątkowość tej metody cechuje odejście od bezpośredniego pomiaru próbki, w tym przypadku moczu pacjenta. Zamiast bezpośredniego pomiaru przygotowano próbkę umożliwiającą analizę metabolity. Przez co uniknięto wpływu bakterii i innych cząstek stałych rozpraszających na pomiar widma absorpcyjnego oraz zwiększono bezpieczeństwo biologiczne podczas pomiarów spektroskopowych. Działanie metody optycznej wsparte zostało algorytmami uczenia maszynowego. Dzięki interdyscyplinarności zastosowane rozwiązanie umożliwia szybką klasyfikację próbek od pacjentów z zakażeniem układu moczowego oraz pacjentów, u których z zakażenia układu moczowego rozwinęły się stany uroseptyczne na podstawie zmian w widmie UV–VIS. W tabeli 4 przedstawiono parametry metrologiczne zaprezentowanej metody.

Tabela 4. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody optycznej z klasyfikacją próbek

Technika optyczna	Spektroskopia UV–VIS
Liczba próbek	241, z każdej próbki zabrane po 5 widm
Typ próbek	Mocz pacjentów
Zakres spektralny	600-750 nm
Rozdzielczość	1 nm
Metoda analizy	Drzewo decyzyjne, algorytm ExtraTreesClassifier
Czas pomiaru i analizy	Do kilkunastu sekund
Dokładność	Do 97% prawidłowych klasyfikacji pacjentów

Pomiar i klasyfikacja zajmuje kilkanaście sekund, co czyni metodę zdolną do testów przesiewowych. Możliwe jest w ten sposób wykrycie na wczesnym etapie stanów zagrażających życiu oraz wcześniejsze rozpoczęcie leczenia, co ogranicza śmiertelność spowodowaną urosepsą. W rozdziale 5 zaprezentowano fantom sztucznego moczu, który odzwierciedla widmo optyczne moczu zdrowych pacjentów w zakresie 240–500 nm. Fantom umożliwia bezpieczne testowanie metod optycznych bazujących na widmie moczu w powyższym zakresie, eliminując konieczność pozyskiwania próbek od pacjentów na wczesnym etapie badań.

4. Optyczna analiza środowiskowa z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej

W rozdziale przedstawiono kontynuację badań właściwości płynnych materiałów biologicznych za pomocą analizy optycznej. Jako obiekt badań posłużyły ścieki. Wyniki badań opublikowano w części artykułu [E], przedstawiającego wykorzystania spektroskopii do monitorowania zmian wartości stężenia biomarkerów w złożonej matrycy biologicznych jakim są ścieki. Opracowana metoda optyczna umożliwia analizę środowiska, poprzez monitorowanie w czasie rzeczywistym zmian stężenia biomarkera, na przykładzie białko C-reaktywne w ściekach.

Wkład doktoranta

W pracy [E] przedstawiającej monitorowanie zmian biomarkera w ściekach doktorant jest pierwszym autorem i wniósł główny wkład w opracowanie metodologii badania. Zaproponował wykorzystanie spektroskopii jako metody umożliwiającej monitorowanie zmian ilości białka C-reaktywnego (CRP) w ściekach. Indywidualny wkład doktoranta od pracy [D] obejmował przeprowadzenie pomiarów optycznych ścieków przy wykorzystaniu spektroskopii absorpcyjnej. Doktorant dobrał narzędzia pomiarowe oraz zaprojektował procedurę pomiarową. Pomiary zostały przeprowadzone w celu analizy przy wykorzystaniu algorytmów uczenia maszynowego (przeprowadzona przez mgr. inż. Kacpra Cierpiaka) w celu szacowania zawartości CRP. Doktorant zadbał o przygotowanie danych, nadzór nad poprawnością danych, usunięcie błędnych pomiarów oraz ich katalogowanie w celu ułatwienia analizy algorytmami uczenia maszynowego. Doktorant uczestniczył również w przygotowaniu próbek, odpowiedzialny był za ustalenie wartości stężeń oraz oszacowanie potrzebnych objętości płynów do badań. Następnie dr inż. Paweł Wityk przygotował próbki do pomiaru o ustalonych stężeniach CRP. W artykule [E] doktorant jest autorem podrozdziału 3.2, współautorem rozdziału 4 i podrozdziału 2.2. Doktorant przygotował abstrakt graficzny, rysunek 4, tabelę 1 oraz 5.

Aktualny stan wiedzy

Współczesna medycyna stoi przed wyzwaniami związanymi zarówno z indywidualną diagnostyką pacjentów, jak i z monitorowaniem zdrowia populacji. Obie strategie, klasyfikacja indywidualna (z rozdziału 3) oraz monitoring populacyjny (detekcja sygnałów ostrzegawczych w środowisku) są spójne z aktualnymi kierunkami rozwoju medycyny. Ścieki to nie tylko odpad, mogą być traktowane jako płynna biopsja populacji, co pozwala na monitorowanie zdrowia publicznego. Ponadto dyrektywa Unii Europejskiej dotycząca ścieków komunalnych wprowadziła obowiązek monitorowania w ściekach parametrów istotnych dla zdrowia, takich jak występowanie wirusów będących sygnałem pojawienia się epidemii [77]. Zastosowanie optycznych metod pomiarowych jako narzędzi diagnostycznych i nadzorczych może wspomóc sposób szybkiego ostrzegania oraz reagowania na rozprzestrzeniające się infekcje, zarówno w ujęciu jednostkowym jak i populacyjnym [78].

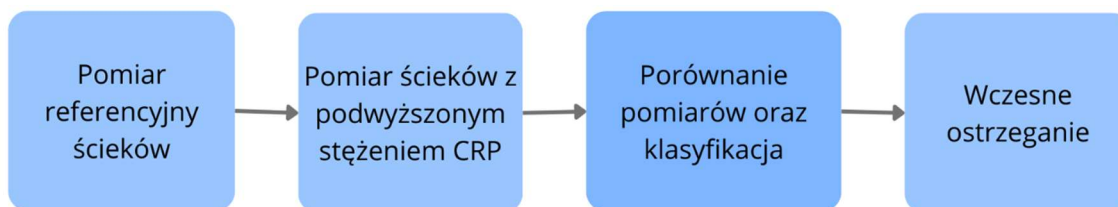
Grupy badawcze podejmowały próby analizy zawartości substancji w ściekach przy wykorzystaniu spektroskopii. Przykładem jest charakterystyka parametrów ściekowych

na podstawie transmitancji surowych ścieków oraz po oczyszczeniu [79]. Badanie potwierdziło skuteczność metod spektroskopowych w monitorowaniu jakości ścieków, zastosowanie metody pozwala na optymalizację dozowania reagentów. Innym przykładem zastosowania spektroskopii UV–VIS w ściekach jest detekcja niskich stężeń antybiotyku w ściekach [80]. W przeciwieństwie do roztworów laboratoryjnych, ścieki stanowią złożoną matrycę, w której sygnały od biomarkerów są często maskowane przez silne tła absorpcyjne materii organicznej i efekty rozpraszania światła.

W kontekście zdrowia publicznego, istotnym markerem stanu zapalnego jest białko CRP [81]. Jego podwyższony poziom może świadczyć o infekcji nawet przed pojawieniem się objawów klinicznych. Monitorowanie zmian stężenia biomarkerów, takich jak CRP na przykład w ściekach miejskich, stanowi nowoczesne narzędzie nadzoru środowiskowego [25]. Dzięki wykorzystaniu zaprezentowanych technik spektroskopowych możliwe jest śledzenie dynamiki zmian CRP w czasie rzeczywistym, co stanowi przewagę nad metodami chromatograficznymi [82]. Monitoring zmian stężenia biomarkerów umożliwia zaawansowana analiza widmowa, np. z zastosowaniem uczenia maszynowego. Zaproponowana metoda może posłużyć jako system wczesnego ostrzegania przed ogniskami chorób zakaźnych, np. w szpitalach, szkołach czy domach opieki. Przedstawione badania z pracy [D] miały na celu monitorowanie podobnie niskich stężeń biomarkerów. Na podstawie przeglądu literatury stwierdzono, że jest to pierwsza tego rodzaju implementacja spektroskopii UV–VIS do nadzoru biomarkerów w ściekach, przeprowadzana w czasie rzeczywistym i bez dodatkowych znaczników.

4.1 Nadzór zmian stężenia CRP w ściekach przy wykorzystaniu metod optycznych

Przeprowadzone badania miały na celu monitorowanie zmian stężenia biomarkera CRP w złożonej matrycy biologicznej jaką są ścieki. Jest to płynna materia zawierająca związki organiczne oraz nieorganiczne ze środowiska oraz pochodzące od ludzi. Wykorzystane do pomiarów ścieki zostały wcześniej scharakteryzowane na podstawie chemicznego zapotrzebowania tlenu, który określa ilość zanieczyszczeń oraz poprzez ilość zawiesin stałych, zasadowości, azotu, fosforenu. Otrzymane ścieki zostały również wcześniej scharakteryzowane fizycznie poprzez określenie poziomu pH, temperatury oraz przewodności elektrycznej. Ścieki zostały pobrane z oczyszczalni ścieków Dębogórze, która przetwarza ścieki z terenu Gdyni i okolic. Zbiory trwały przez 3 miesiące (sierpień–październik 2023) i łącznie zebrano 14 próbek z różnych dni. Był to pierwszy etap badań, kolejne przedstawiono na rysunku 12.



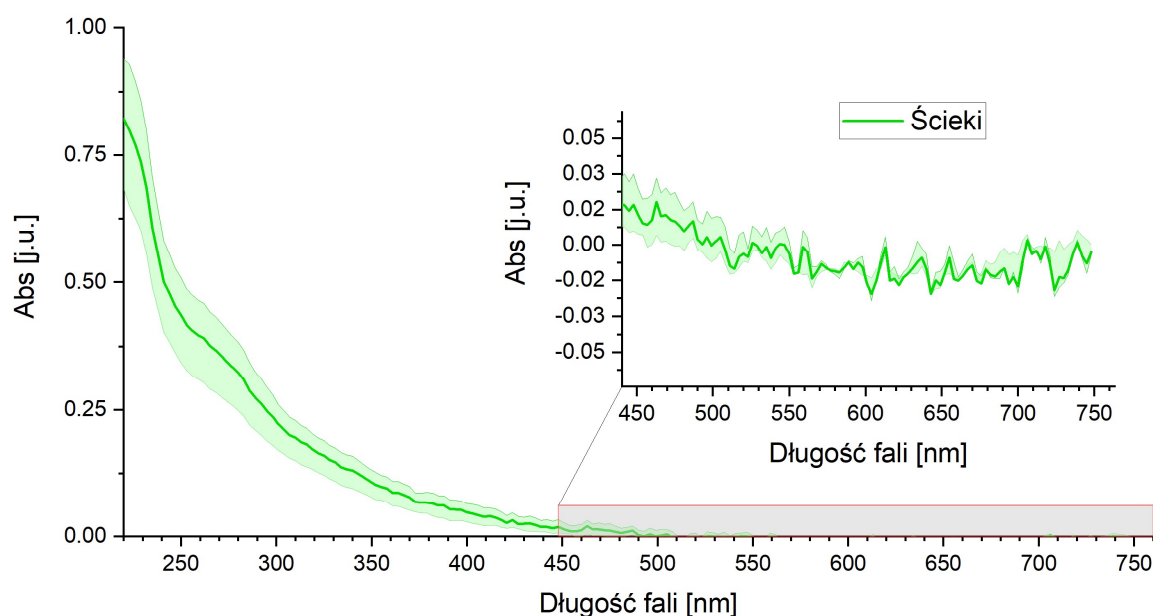
Rysunek 12. Schemat badań mających na celu monitorowanie stężenia CRP w ściekach

Kolejnym krokiem było przygotowanie próbek ścieków z dodanym białkiem CRP w celu zasymulowania wzrostu stężenia w populacji objętej monitorowaniem. Przygotowano roztwory o stężeniach na poziomie od 10^{-4} do 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$ CRP w ściekach. Jako biomarker zaproponowano białko

CRP o czystości 90–95% (Merck, Niemcy), które nie jest specyficznym biomarkierem na patogeny lub choroby, ale jest biomarkierem stanów zapalnych. Jego stężenie w krwi może wzrosnąć nawet tysiąckrotnie w ciągu kilku godzin od wystąpienia infekcji lub uszkodzenia tkanek, stężenie wtedy może wynosić kilkaset $\mu\text{g/ml}$ [83]. Wysoka zmienność jest zaletą w przypadku próby monitorowania zmiany stężenia biomarkera w środowisku. Dzięki wysokiemu stężeniu w organizmie, można zakładać, że może pojawić się również w wystarczającej do detekcji ilości w ściekach [84]. W badaniach środowiskowych celem nie jest określenie dokładnej wartości stężenia, tylko monitorowanie zmian poziomu biomarkera CRP, ponieważ nawet drobne wzrosty mogą oznaczać wystąpienie infekcji w badanej populacji.

Skuteczne monitorowanie zmian stężenia CRP w ściekach wymaga dobrania odpowiedniej aparatury pomiarowej. Do rejestracji widm wykorzystano spektrofotometr UV–VIS Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) przystosowany do pomiarów próbek ciekłych. Kluczowymi parametrami urządzenia jest zakres pomiarowy długości fali 200–750 nm przy rozdzielczości widmowej 3 nm. Parametry te umożliwiają analizę sygnałów optycznych związanych z obecnością białek oraz metabolitów w matrycy biologicznej, jaką są ścieki. Zaletą zastosowania metody spektroskopowej jest możliwość automatyzacji pomiarów, brak potrzeby stosowania odczynników chemicznych, ponieważ detekcja odbywa się bezpośrednio na podstawie sygnału optycznego, który jest zbierany kilkanaście razy na minutę.

Analizę pomiarów rozpoczęto od charakteryzacji widma próbek z 3 miesięcy, pozwoliło to na uśrednienie poziomu widma w celu określenia szumu tła związanego z naturalną zmiennością składu ścieków. Dodatkowo wykonano mieszanki próbek z różnych dni w celu poprawy analizy wpływu zmian składu matrycy biologicznej na rejestrowane widmo. Każdą próbkę mierzono 3 razy i przeprowadzono normalizację względem próbki referencyjnej wody. Krzywe przedstawiono na rysunku 13, przedstawiają widmo po odjęciu pomiaru referencyjnego.



Rysunek 13. Uśrednione widmo optyczne zebranych ścieków wraz z zakresem zmian widma

Uzyskane widma dla próbek ścieków wykazały różnice w intensywności sygnału na całym zakresie pomiarowym. Zmiany były największe na początku zakresu pomiarowego, w paśmie 220-450 nm zmiany związane są między innymi z obecnością białek. Ze względu na złożoność matrycy zdecydowano wesprzeć się algorytmami uczenia maszynowego w celu dalszej analizy.

Dobrano cechy analizowane przez algorytm takie jak pole pod krzywą absorbancji, wariancja sygnału, mediana absolutnego odchylenia, prominencja oraz liczba i szerokość pików w wybranym oknie spektralnym. Celem wykorzystania algorytmów uczenia maszynowego była klasyfikacja polegająca na rozdzieleniu próbki na 2 typy stężeń do badań. Wartością graniczną było 10^{-4} µg/mL, zmiana wartości granicznej jest możliwa poprzez wprowadzenie zmian do algorytmu. Powstała klasa z $CRP \leq 10^{-4}$ µg/mL oraz klasa z $CRP > 10^{-4}$ µg/mL. W ten sposób algorytm wykorzystany zostanie do wczesnego ostrzegania, po przekroczeniu ustalonego stężenia na podstawie średniej dla danej monitorowanej populacji. Wartość progowa może ulegać korekcji w zależności od tła biologicznego, czyli bazowego stężenia w ściekach w określonym przedziale czasowym, zmniejszając w ten sposób fałszywą detekcję nowych ognisk. Z łącznie zebranych 1080 widm wylosowano 720 do treningu algorytmu oraz 360 do testowania. Najlepsze rezultaty uzyskano dla algorytmu drzewa decyzyjnego, który osiągnął dokładność klasyfikacji na poziomie 68,1%, oznacza to możliwość wykorzystania metody do celów przesiewowych i monitorowania trendów zmian w ściekach. Parametry techniczne opracowanej metody przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody nadzoru w ściekach

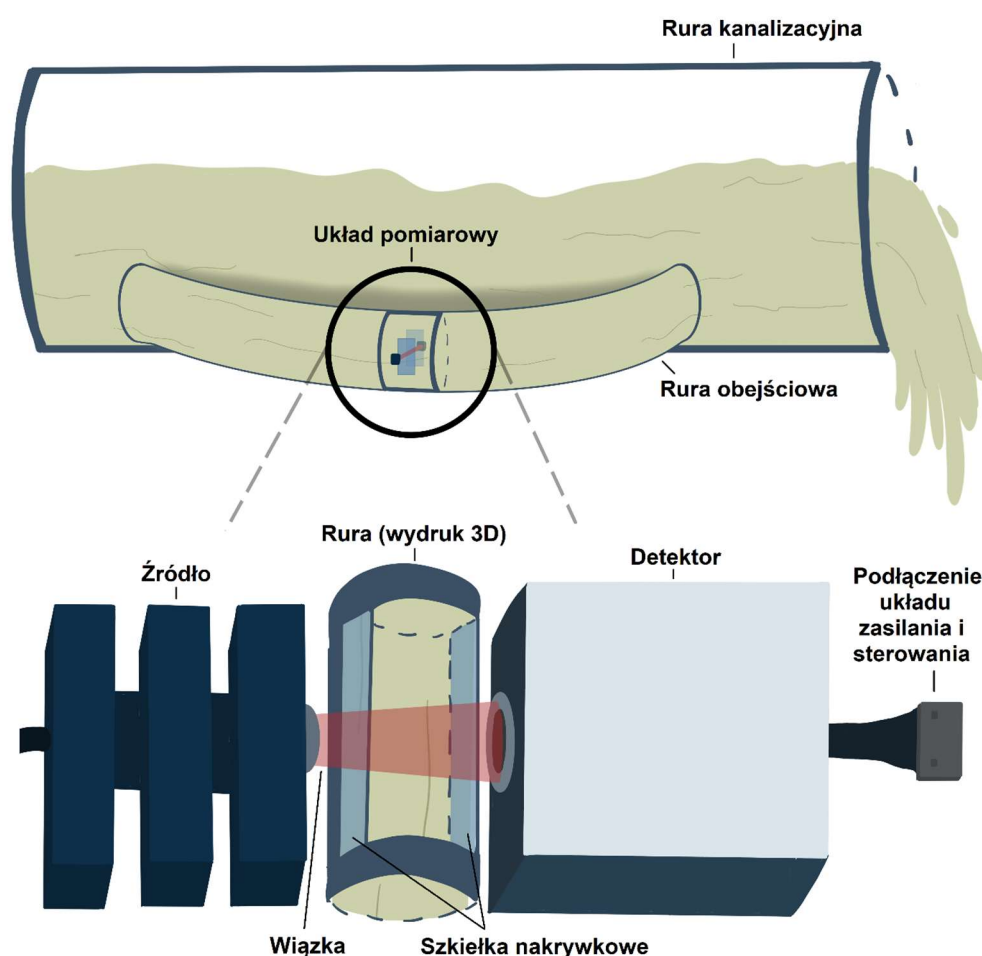
Technika optyczna	Spektroskopia UV–VIS
Liczba próbek	14 próbek ścieków (pobranych na przestrzeni 3 miesięcy)
Typ próbek	Ścieki z oczyszczalni
Zakres spektralny	220-750 nm, zarejestrowany z krokiem co 1nm
Zakres pomiarowy	Stężenia CRP od 10^{-4} µg/mL do 10^{-1} µg/mL
Limit detekcji	0,1 µg/L
Metoda analizy	Drzewo decyzyjne, algorytm ExtraTreesClassifier
Czas pomiaru i analizy	Do kilkunastu sekund
Dokładność	Do 68,1% prawidłowych klasyfikacji stężeń

Można zakładać, że wzrost ilości pomiarów i zebranie próbek ścieków z dłuższego okresu pozwoli na optymalizację działania algorytmu, poprzez lepsze uśrednienie ścieków lub predykcje składowych widma w badanym miesiącu możliwe będzie zwiększenie dokładności klasyfikacji. Wyzwania, jakie mogą wystąpić podczas dalszych badań to występowanie zawiesin oraz tymczasowe wystąpienie zanieczyszczeń chemicznych, jak np. barwniki lub metale ciężkie. Może to również zostać zaimplementowane do algorytmu.

4.2 Miniaturyzacja i integracja spektroskopowego układu pomiarowego

Po przetestowaniu metody w warunkach laboratoryjnych, opracowano prototyp, mający na celu miniaturyzację układu do optycznego nadzoru ścieków. Koncepcja prototypu systemu wdrożeniowego

przedstawiona została na rysunku 14. Do rury kanalizacyjnej należy dołączyć rurę obejściową, w której przymocowany zostanie zaprojektowany element rury wyprodukowany w technologii druku 3D. Element ten zawiera okna umożliwiające transmisję wiązki promieniowania optycznego przez badany obiekt (ścieki). Do pierwszego okna doprowadzono źródło promieniowania optycznego, w tym celu wykorzystano źródła LED (producent OceanOptic, USA) o środkowej długości fali odpowiednio 470 nm, 533 nm oraz 635 nm. Do kolejnego okna doprowadzono detektor, spektrometer (Ocean Insight, USA), który odbiera sygnał optyczny po przejściu przez medium. Długość drogi optycznej można regulować zmieniając elementy rury wydrukowanej w technologii 3D. W przypadku obiektów o niskiej absorpcji, jakimi są ścieki, które w dużej mierze składają się z wody, dłuższa droga optyczna może pozytywnie wpłynąć na detekcję rejestrowanej absorpcji. Do testów wybrano długość drogi optycznej wynoszącą 4 cm.



Rysunek 14. Schemat prototypowego układu do nadzoru ścieków w rurze kanalizacyjnej

W warunkach laboratoryjnych źródło oraz detektor było zasilane i sterowane z wykorzystaniem oprogramowania na przenośnym komputerze. Rozwiązanie to można w prosty sposób zaadaptować do zastosowań terenowych poprzez wykorzystanie kontrolerów typu Raspberry PI w połączeniu z zasilaniem bateryjnym. Zrealizowany układ prototypowy przedstawiono na rysunku 15.

Pierwszy test przeprowadzono na wydrukowanym w technologii druku 3D sześciennym, w którym w dwóch przeciwległych, równoległych ściankach osadzono szkiełka nakrywkowe pełniące funkcję

okien pomiarowych (rysunek 15a). Wnętrze sześcianu wypełniono ściekami, co umożliwiło przeprowadzenie pomiaru. W kolejnym etapie sześcian zastąpiono wydrukowanym odcinkiem rury o identycznym rozstawie okien pomiarowych (rysunek 15b). Układ pozwolił na odwzorowanie warunków zbliżonych do pomiarów w przewodach kanalizacyjnych.

Wydruk wypełniono wcześniej przygotowanymi ściekami w celu przeprowadzenia pomiaru referencyjnego. Następnie do próbki dodano białko CRP, uzyskując stężenie 10^{-4} µg/mL. Badania przeprowadzono na próbkach ścieków pobranych w trzech różnych dniach, sygnały pomiarowe zebrano dla długości fali 470 nm, 533 nm oraz 635 nm (rysunek 15c-e). Każdy pomiar wykonano pięciokrotnie, w odstępach czasu 1 s.

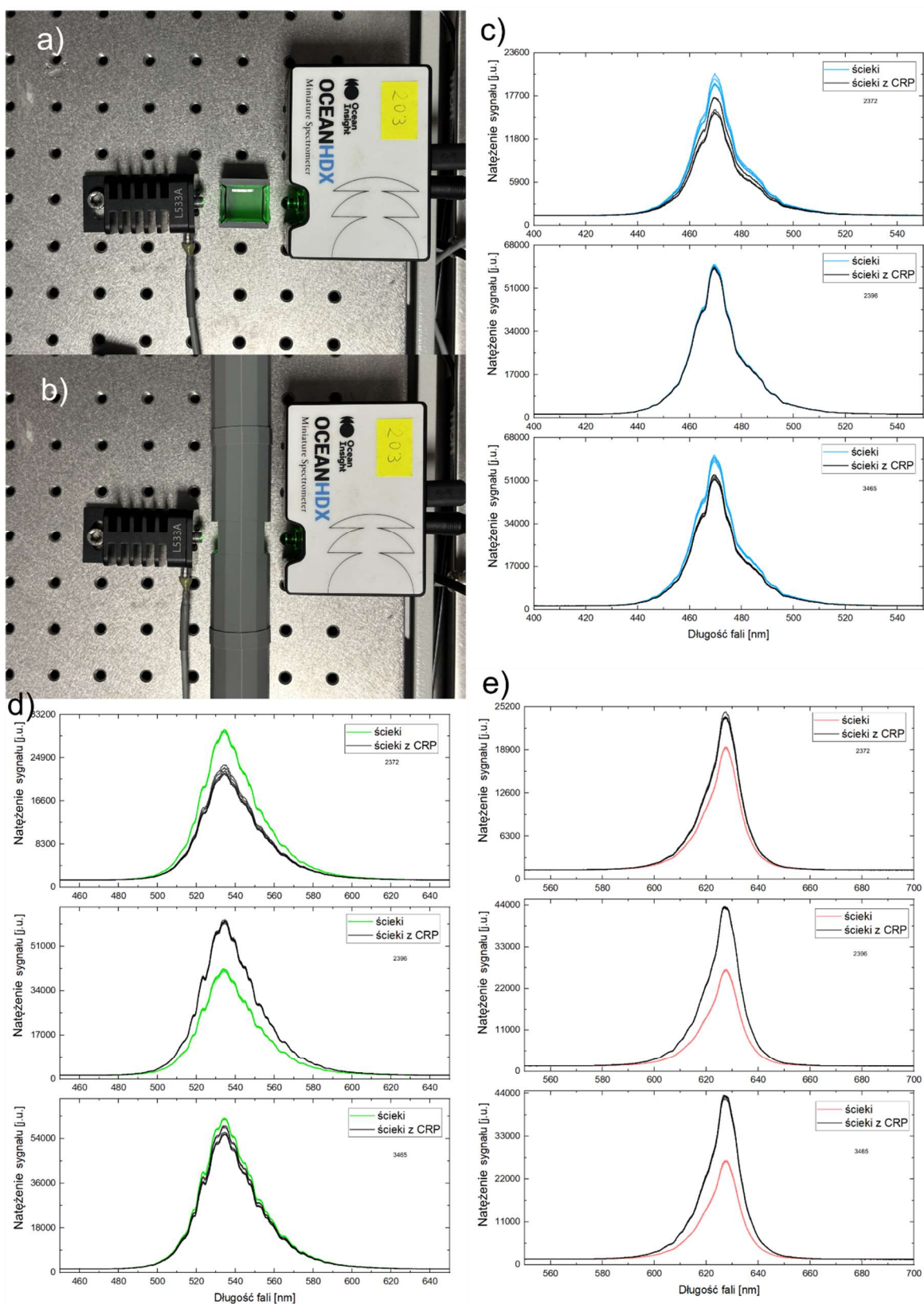
Dla pomiarów na długości fali 470 nm, każdy pomiar ścieków z CRP cechował się większą absorpcją promieniowania w porównaniu z próbką referencyjną. Zmiana natężenia sygnału była inna dla każdej próbki. Najmniejsza zarejestrowana zmiana intensywności wynosiła 0,63%, natomiast najwyższa 26,44%. Dla długości fali 533 nm zaobserwowano fluktuacje sygnału jako nieregularne wzrosty i spadki natężenia w zależności od dnia poboru próbki. Zjawisko to może być związane z obecnością zanieczyszczeń w próbce, w tym większych cząstek zawieszonych lub obiektów pływających w ściekach, które chwilowo zakłócały pomiar. Rozwiązaniem na występujący problem może być zwiększenie ilości pomiarów oraz wydłużenie czasu interwału pomiarowego. Dla ostatniej długości fali 635 nm zaobserwowano wzrost natężenia rejestrowanego sygnału dla każdej próbki zawierającej CRP.

Na podstawie zarejestrowanych widm przeprowadzono analizę wpływu biomarkerów CRP na właściwości optyczne badanych próbek ścieków (oznaczonymi kodami 2372, 2396, 2465). Analiza porównawcza przeprowadzono na długości fali 470, 533 oraz 635 nm. Wyznaczono maksymalne natężenie sygnału dla każdej z nich, a następnie wartości te uśredniono oddzielnie dla pomiarów referencyjnych (ścieków) i pomiarów właściwych (ścieków z CRP). W celu łatwiejszego porównania wpływu biomarkera, obliczono stosunek średniego natężenia amplitud występujących w próbkach właściwych do referencyjnych:

$$R = \frac{I_{crp}}{I_{ref}} \quad (4)$$

gdzie I_{crp} to średnie natężenie sygnału dla próbek zawierających CRP w ściekach, a I_{ref} to ścieki bez dodatkowego biomarkera.

Dodatkowo obliczono procentową zmianę natężenia sygnału w stosunku do pomiaru referencyjnego. W tabeli 6 przedstawiono zestawienie obliczonych stosunków natężeń sygnałów oraz zmiany natężenia dla poszczególnych długości fal.



Rysunek 15. Zrealizowany układ monitorowania ścieków a) w kostce, b) w rurze imitującej przewód kanalizacyjny, c) pomiary natężenia sygnału dla źródła 470 nm, d) pomiary natężenia sygnału dla źródła 533 nm, e) pomiary natężenia sygnału dla źródła 635 nm

Tabela 6. Zestawienie zmian parametrów absorbancji dla wybranych długości fali

Długość fali	Kod próbki	Współczynnik stosunków natężeń (ścieki z CRP/ścieki czyste)	Zmiana natężenia [%]
470 nm	2372	0,848	-7,2
	2396	0,984	-0,7
	2465	0,881	-5,5
	Średnia	0,904	-4,46
533 nm	2372	0,780	-10,8
	2396	1,398	14,5
	2465	0,931	-3,1
	Średnia	1,036	-0,2
635 nm	2372	1,160	6,5
	2396	1,453	16,2
	2465	1,45	16,1
	Średnia	1,354	12,9

Przeprowadzona analiza wstępna wykazała mierzalne zmiany amplitud natężenia w badanych próbkach, co potwierdza potencjał zastosowania miniaturowego prototypu w monitorowaniu ścieków. Długością fali, przy której dodanie CRP zwiększyło intensywność rejestrowanego sygnału dla wszystkich próbek jest 635 nm. Odwrotny efekt zaobserwowano dla długości fali 470 nm, dodanie CRP spowodowało spadek sygnału. Dla długości 533 nm nie zaobserwowano trendu zmian. Kluczowym wyzwaniem w dalszej analizie jest wysoka zmienność składu ścieków, co wpływa na zjawisko rozpraszania światła i może zaburzać otrzymane wyniki. W celu wyeliminowania zakłóceń oraz identyfikacji nieliniowych zależności, rekomenduje się zastosowanie algorytmów uczenia maszynowego, podobnie jak miało to miejsce w metodzie przed miniaturyzacją do prototypu.

Podsumowując, zrealizowana metoda optyczna monitorowania CRP jest kolejną zaprezentowaną implementacją systemu opartego na spektroskopii UV–VIS. Przedstawiona metoda działa jako narzędzie do monitorowania zmian stężenia biomarkera CRP w ściekach. Taki system może być bezobsługowy, rozproszony oraz niedrogi w implementacji, np. w studzienkach kanalizacyjnych. Proponowana metoda została przetestowana laboratoryjnie z wykorzystaniem analizy ML. Badania z powodzeniem przeprowadzono w złożonej matrycy biologicznej będącej wyzwaniem do analizy, ze względu na ilość znajdujących się w niej związków chemicznych. System monitorowania został przetestowany dla wartości progowej 10^{-4} µg/mL CRP w ściekach, wykazując zdolność detekcji markerów stanów zapalnych. Zaprojektowany system można poddać miniaturyzacji, wykorzystując spektrofotometr UV–VIS połączony z mikrokontrolerem, dzięki czemu możliwa będzie analiza algorytmem ML stężenia biomarkera w czasie rzeczywistym oraz moduł transmisji danych w celu wysyłania alertów do jednostek ochrony zdrowia. Potencjalnymi miejscami wdrożenia systemu mogą być szkoły, przedszkola, akademiki, jak również całe osiedla mieszkaniowe, szpitale, domy opieki lub zakłady pracy.

5. Światłowodowa interferometria niskokoherencyjna w badaniu optycznych właściwości produktów spożywczych imitujących właściwości optyczne tkanek

W rozdziale przedstawiono badania wybranych produktów spożywczych mogących pełnić funkcje fantomów tkanek biologicznych. Badania przeprowadzone zostały przy użyciu czujnika światłowodowego bazującego na interferometrii niskokoherencyjnej oraz refraktometrze. Celem badań był pomiar zmian wybranego parametru optycznego w fantomie w funkcji temperatury. W rozdziale zawarto badania z części artykułu [F], gdzie opisano badania nad zmianą współczynnika załamania w kurzym jajku. Rozdział rozszerzony został o badania mające na celu wstępną charakterystykę wybranych parametrów optycznych napojów roślinnych.

Wkład doktoranta

W pracy [F], przedstawiono wpływ temperatury na zmianę współczynnika załamania w wybranych materiałach biologicznych. Jako obiekt badań posłużyło jajo kurze, którego składniki, żółtko i białko analizowano oddzielnie. Produkt ten może imitować tkanki biologiczne. Doktorant samodzielnie przeprowadził badania oraz samodzielnie przygotował publikację. Do badań zastosował układ niskokoherencyjnej interferometrii Fabry'ego-Perota do rejestracji sygnałów optycznych, z których następnie wyznaczył współczynnik załamania próbki dla długości fali 1550 nm. W niniejszym rozdziale doktorant rozszerzył badania opisane w pracy [F] o analizę współczynnika załamania dla długości fali 1050 nm. Przeprowadził również badania dla innego materiału biologicznego, jakim są mleka oraz napoje roślinne, tym razem w zakresie widzialnym przy wykorzystaniu refraktometru. Wszystkie grafiki oraz wyniki zawarte w rozdziale zastały wykonane przez autora.

Aktualny stan wiedzy

Produkty spożywcze, takie jak jaja kurze, mleko czy oleje, są łatwo dostępne i mogą służyć jako modele odwzorowujące właściwości tkanek biologicznych. Ze względu na zbliżony skład chemiczny oraz fizyczny do tkanek, produkty spożywcze mogą symulować kluczowe właściwości optyczne, chemiczne lub mechaniczne struktur biologicznych [85]. Dzięki temu mogą one być zastosowane jako materiały referencyjne lub kalibracyjne do walidacji metod optycznych przeznaczonych do pomiarów tkanek [86,87]. Dodatkową zaletą wykorzystania produktów spożywczych jako fantomów może być ich biodegradowalność oraz powtarzalność parametrów, ze względu na procedury pozyskiwania, skład oraz systemy bezpieczeństwa żywności. Niskie koszty związane z ich pozyskiwaniem oraz brak konieczności zgody komisji bioetycznej umożliwiają przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań, nawet przy ograniczonych zasobach finansowych, co jest szczególnie ważne w fazie wstępnej opracowywania nowych technologii.

Wybrane produkty spożywcze stanowią ekonomiczne alternatywy dla specjalistycznych materiałów syntetycznych czy preparatów laboratoryjnych oraz ograniczają wykorzystanie żywych organizmów. W literaturze opisane jest wykorzystanie produktów spożywczych jako fantomów, np. jajko zostało już wcześniej wykorzystane do pomiarów ultrasonicznych, jako fantom imitujący tkanki [88,89].

Innym materiałem spożywczym komercyjnie dostępnym jest tofu, które również zostało przebadane do badań w ultrasonografii, jako zamiennik syntetycznych fantomów [90]. W przypadku metod obrazujących, np. mammografii, jako fantom wykorzystano warzywa. Przykładem jest fantom na bazie bakłażana [91]. W przypadku badań rezonansem jako fantom posłużyła śmietana o różnej zawartości tłuszczu [92]. To tylko przykłady zastosowań obrazujące, jak szeroki jest zakres produktów spożywczych, które mogą posłużyć jako alternatywa dla fantomów syntetycznych w różnych metodach badawczych. W przypadku poniższej pracy wybrano produkty w celu imitacji tkanek i próbek biologicznych do walidacji sensorów optycznych, głównie *in situ* poprzez czujniki światłowodowe.

Jako kluczowy parametr optyczny do opisu właściwości tkanek wytypowano współczynnik załamania światła (RI), stanowiący wielkość diagnostyczną [93,94]. W przypadku produktów spożywczych zmiana RI może mieć zastosowanie m.in. w kontroli jakości żywności oraz ocenie świeżości produktu [95–97]. W tkankach biologicznych zmiany współczynnika załamania niosą istotne informacje diagnostyczne, na przykład w kontekście wykrywania zmian nowotworowych [98]. Dlatego monitorowanie dynamiki zmian RI, a nie tylko ustalenie wartości bezwzględnej, umożliwia śledzenie rozwoju procesów patologicznych. Z uwagi na niedostateczną liczbę danych literaturowych dotyczących parametrów optycznych produktów spożywczych, zwłaszcza w zakresie podczerwieni, podjęto decyzję o przeprowadzeniu badań mających na celu charakterystykę wybranych parametrów optycznych w tym zakresie. W tabeli 7 zebrano informacje o współczynnikach załamania badanych produktów spożywczych, jak można zaobserwować, współczynniki załamania podawane są dla długości 589 nm lub 633 nm. Poniższa tabela wskazuje, że brakuje danych odnośnie współczynników załamania w zakresach bliskiej podczerwieni.

Tabela 7. Współczynniki załamania wybranych produktów spożywczych

Produkt	Współczynnik załamania	Komentarz	Ref.
Białko kurzego jajka	1,3575	Pomiar w temperaturze 23°C, dla długości fali 589 nm	[99]
Żółtko kurzego jajka	1,413 ± 0,001	Dla długości fali 589 nm, brak informacji o temperaturze podczas pomiaru	[100]
Mleko krowie	1,3444-1,3469 – 0% tłuszczu 1,3444-1,3483 – 1,5% tłuszczu 1,3462-1,3525 – 3,5% tłuszczu	Pomiar w temperaturze pokojowej, dla długości fali 633 nm	[101]
Napoje roślinne	1,345 ± 0,085 – mleko migdałowe	Pomiar w temperaturze 30°C, dla długości fali 589 nm	[102]

Podczas badań zwrócono uwagę na wpływ zmiany temperatury na wartość współczynnika załamania. Dla materiałów biologicznych wartość RI maleje wraz ze wzrostem temperatury, spowodowane jest to zmianą gęstości badanego produktu wraz z temperaturą [103]. Można

wykorzystać tą zależność do lepszego imitowania współczynnika załamania tkanek biologicznych poprzez utrzymanie fantomu w odpowiedniej temperaturze. W przypadku liniowej zmiany współczynnika załamania wraz ze zmianą temperatury możliwe jest wykorzystanie zależności do walidacji poprawności działania czujników światłowodowych.

W trakcie badań szczególny nacisk położono na charakterystykę optyczną w rozszerzonym zakresie widmowym, obejmującym również podczerwień. Takie podejście umożliwia identyfikację materiałów do wykorzystania jako materiały referencyjne lub kalibracyjne, które mogą być wykorzystane do walidacji opracowywanych czujników światłowodowych działających w zakresie podczerwieni. Możliwość wykorzystania w tym celu produktów spożywczych może obniżyć koszt walidacji czujników. Wykonując pomiary RI dla kilku długości fali można wyznaczyć dyspersję współczynnika załamania. Określa ona zmianę wartości RI wraz ze zmianą długości fali promieniowania. Zjawisko dyspersji można opisać za pomocą modelu Cauchy'ego [104]:

$$RI(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (5)$$

Model ten zakłada, że współczynnik załamania maleje wraz ze wzrostem długości fali, oznaczonej jako λ . Wzór zawiera współczynniki empiryczne (A, B, C), charakterystyczne dla danego materiału. W praktyce model upraszcza się do wyznaczenia współczynnika A, określającego wartość RI przy nieskończonej długości fali i B określającego wpływ dyspersji związany z obecnością struktur molekularnych badanego obiektu, a wartość C służy do korekty zmian dyspersji. Współczynnik C stosowany jest dla krótszych długości fali, natomiast dla dłuższych zostaje pomijany ze względu na znikomą wartość, co pozwala uprościć model. Do wyznaczenia dyspersji potrzeba co najmniej dwa pomiary RI dla różnych długości fali. Następnie aproksymuje się krzywą z pomiarami, żeby dopasować do funkcji Cauchy'ego.

Pomiary produktów spożywczych przeprowadzono w zakresie podczerwieni, co stanowi niekonwencjonalne, lecz istotne podejście w kontekście wyznaczania współczynnika załamania, który najczęściej podaje się dla długości fali 589 nm. Światłowodowe czujniki, oparte na światłowodach telekomunikacyjnych, osiągają najwyższą efektywność działania w tzw. oknach transmisyjnych, zlokalizowanych m.in. przy 1310 nm oraz 1550 nm [105]. Tradycyjne przyrządy do pomiaru RI, takie jak refraktometry Abbego są zazwyczaj przeznaczone do pracy w zakresie światła widzialnego [106]. Wynika to z charakterystyki stosowanych źródeł promieniowania, detektorów oraz konstrukcji komponentów optycznych. Podejmowane są próby pomiarów w zakresie bliskiej podczerwieni przez modyfikacje refraktometrów Abbego, zmieniając detektory oraz kompensując dyspersję elementów optycznych wewnątrz urządzenia [107]. Metoda nie znalazła powszechnego zastosowania, ze względu na zwiększoną absorpcję wody w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) pomiary często stają się nieprecyzyjne ze względu na rozmycie granicy między obszarem całkowitego i częściowego odbicia, co utrudnia odczyt RI z refraktometru.

Kolejną metodą umożliwiającą pomiar RI w zakresie podczerwieni jest technika elipsometryczna [108]. Metoda bazuje na pomiarach zmiany polaryzacji promieniowania po odbiciu od powierzchni badanej próbki. Chociaż jest uważany za jedną z najdokładniejszych metod pomiaru RI to jej stosowanie wymaga modelowania na podstawie zmierzonych współczynników odbicia przy różnych polaryzacjach, długościach fali i kątach padania wiązki [109]. Model następnie dopasowuje się do uzyskania danych pomiarowych, by uzyskać współczynnik załamania, co zwiększa złożoność metody.

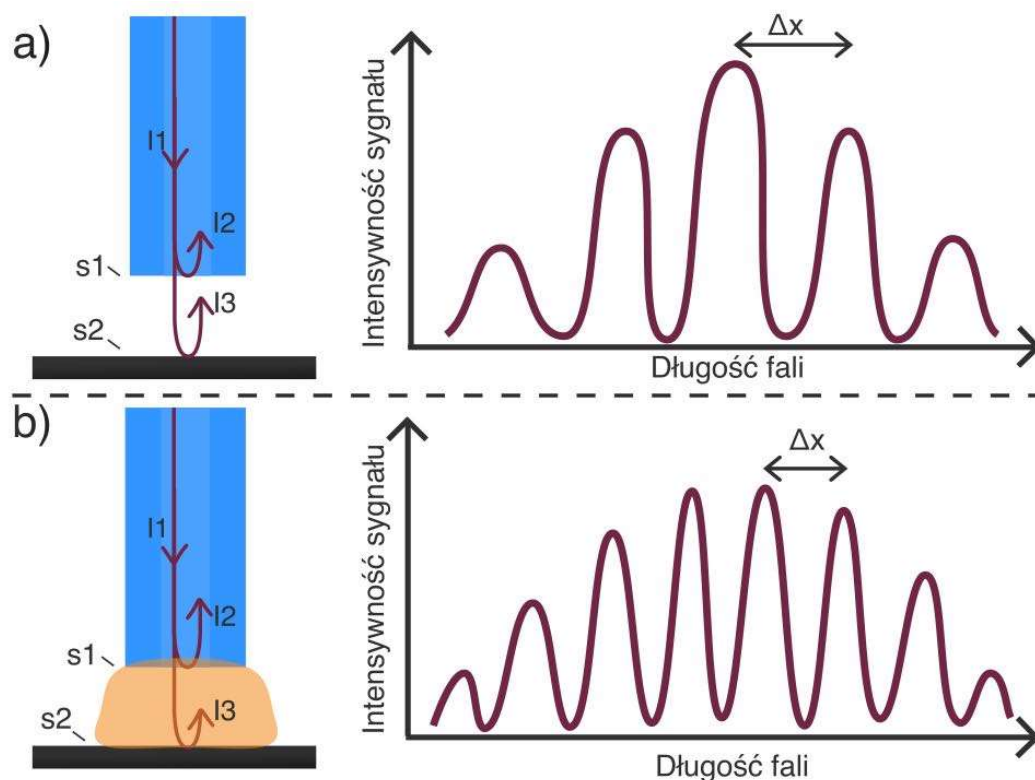
Na tle dostępnych rozwiązań czujniki światłowodowe wyróżniają się możliwością pomiaru RI w czasie rzeczywistym [110]. Dzięki transmisji sygnału optycznego na duże odległości możliwy jest również pomiar zdalny. Tylko w miejscu znajdowania się próbki wymagany jest światłowod, natomiast źródło i analizator może znajdować się w odległości setek kilometrów [111]. Może to być istotne w pomiarach w fabrykach, gdzie mogą występować wysokie temperatury, wilgotność lub inne trudne warunki środowiskowe wykluczające pracę sprzętu elektrycznego, natomiast nie są one przeszkodą do doprowadzenia czujnika światłowodowego.

5.1 Układ pomiarowy z wykorzystaniem interferometru światłowodowego

Do pomiarów współczynnika załamania zastosowano światłowodowy niskokoherencyjny interferometr typu Fabry-Perot (FPI), który cechuje się wysoką czułością na zmian RI badanego ośrodka oraz szybkim czasem reakcji [112,113]. Zaproponowane podejście pozwala na prowadzenie pomiarów *in situ* w czasie rzeczywistym wpływu temperatury na wartość współczynnika załamania światła.

Do pomiarów RI próbek biologicznych zastosowano konfigurację FPI, w której wnęka interferencyjna tworzona jest pomiędzy czołem światłowodu, a odbijającym materiałem (np. zwierciadłem lub metalem), na którym umieszczana jest próbka. Otwarta struktura wnęki interferometru Fabry'ego-Perota jest łatwa do czyszczenia oraz łatwo do niej wprowadzić próbkę. Dodatkowo konstrukcja umożliwia łatwą modyfikację, zarówno wymiarów wnęki, jaki i dodanie dodatkowych warstw na końcówkę światłowodu lub powierzchnię objającą, na której umieszczana jest próbka. Zaproponowana metoda ze światłowodowym FPI jest kompaktowa, umożliwia badania *in situ* oraz integrację z układami światłowodowymi.

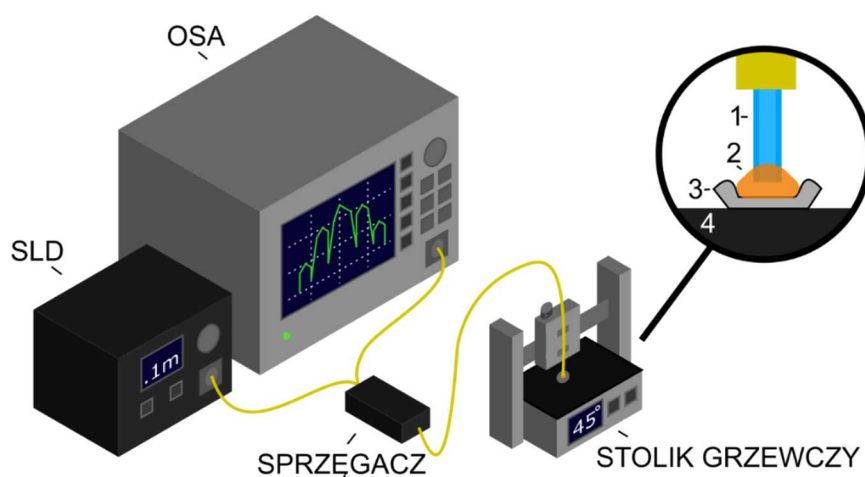
Zjawisko interferencji w przypadku układu Fabry'ego-Perota polega na wielokrotnym odbiciu wiązki w interferometrze optycznym zdefiniowanym przez dwie odbijające powierzchnie [114]. W niniejszej pracy wykorzystano FPI w konfiguracji z wnęką interferencyjną powstałą między czołem światłowodu i prostopadle do niej ustawionym materiałem refleksyjnym, na którym umieszcza się badaną próbkę.



Rysunek 16. Schemat przedstawiający wpływ zmiany współczynnika załamania wewnątrz wnęki w niskokoherencyjnym interferencyjnym światłowodowym czujniku Fabry'ego-Perota na otrzymany sygnał pomiarowy. a) wnęka wypełniona powietrzem $RI \approx 1$, b) wnęka wypełniona próbką o $RI > 1$, powoduje to zmianę długości drogi optycznej, co objawia się w zmianie fazy, widocznej w zmianie odległości między rejestrowanymi prążkami Δx

Do światłowodu wprowadzana jest wiązka o niskiej koherencji (I_1), która następnie ulega częściowemu odbiciu (I_2) i dalszej transmisji (I_3), tworzących wnękę interferencyjną na powierzchniach granicznych (S_1 – granica czoła światłowodu i wnęka interferometru oraz S_2 – granica wnęki interferometru i podłoże dla próbki o dużym współczynniku odbicia). W rezultacie wewnątrz wnęki interferencyjnej dochodzi do superpozycji wielokrotnie odbitych fal optycznych. W większości przypadków wpływ wielokrotnych odbić na sygnał wyjściowy jest niewielki ze względu na niski współczynnik odbicia promieniowania optycznego na granicy czoła światłowodu i wnęki interferometru, dlatego zdecydowano się na zastosowanie aproksymacji dwuwiązkowej, tak jak przedstawiono na rysunku 16. Rezultat zjawiska interferencji, można zaobserwować we wiązce propagowanej do odbiornika, analogicznie jak w rozdziale 2. Od różnicy faz wiązek zależy modulacja częstotliwości spektralnej rejestrowanego sygnału pomiarowego. Zmiana współczynnika załamania światła we wnęcie interferometru, poprzez wprowadzenie próbki lub zmiany jej temperatury, czyli zmiany RI wewnątrz wnęki, powoduje modyfikację efektywnej drogi optycznej. Zmiana długości drogi optycznej powoduje przesunięcie faz pomiędzy interferującymi wiązkami, co jest widoczne w rejestrowanym rozkładzie widmowym. Przedstawione zależności pozwalają na wzajemne wyznaczenie parametrów wnęki, jej fizycznej długości przy znanym współczynniku załamania, jak i określenie wartości współczynnika załamania ośrodka, jeśli znana jest geometria wnęki.

Początkowy układ pomiarowy (rys. 17) zbudowano z analizatora widma optycznego (Ando AQ6319, Yokohama, Japonia), będącego procesorem sygnału optycznego, szerokopasmowego źródła promieniowania o długości fali centralnej 1550 nm i szerokości spektralnej 35 nm (SLD-1550-12, FiberLabs Inc., Japonia), sprzęgacza światłowodowego 2:1 oraz płytki grzewczej. Do sprzęgacza przyspawano ok. 1 m odcinka jednomodowego światłowodu SMF-28, jednego z najpowszechniej stosowanych światłowodów jednomodowych w systemach transmisyjnych. Układ wykorzystuje źródło o stosunkowo szerokim widmie w porównaniu do lasera. Krótka droga koherencji źródła pozwala na wysoką rozdzielczość osiową. Dodatkowo układ pozwala na łatwą zmianę źródeł światła, w celu pomiaru parametrów dla innej długości fali. Mikromechaniczny system pozycjonujący umożliwia ustawienie końcówki światłowodu prostopadłe do powierzchni refleksyjnej, zapewniając równoległe i stabilne ustawienie obu płaszczyzn. Dodatkowo, za pomocą śrub mikrometrycznych możliwa jest regulacja długości wnęki interferometru z dokładnością do 10 μm .



Rysunek 17. Schemat układu pomiarowego do badania wpływu temperatury na zmiany RI próbek biologicznych. 1-światłowód, 2-próbka, 3-szalka aluminiowa, 4-płytka grzewcza

Poprzez analizę zarejestrowanego widma z interferencją możliwe jest wyznaczenie długości drogi optycznej, która jest zależna od współczynnika załamania światła wewnątrz wnęki interferometru oraz jej fizycznej długości. Pomiar odstępów między prążkami widmowymi oraz położenie prążka centralnego pozwala na wyznaczenie RI wewnątrz wnęki interferencyjnej. Gdy wartość RI medium wypełniającego wnękę jest znana, możliwe jest wyznaczenie długości wnęki.

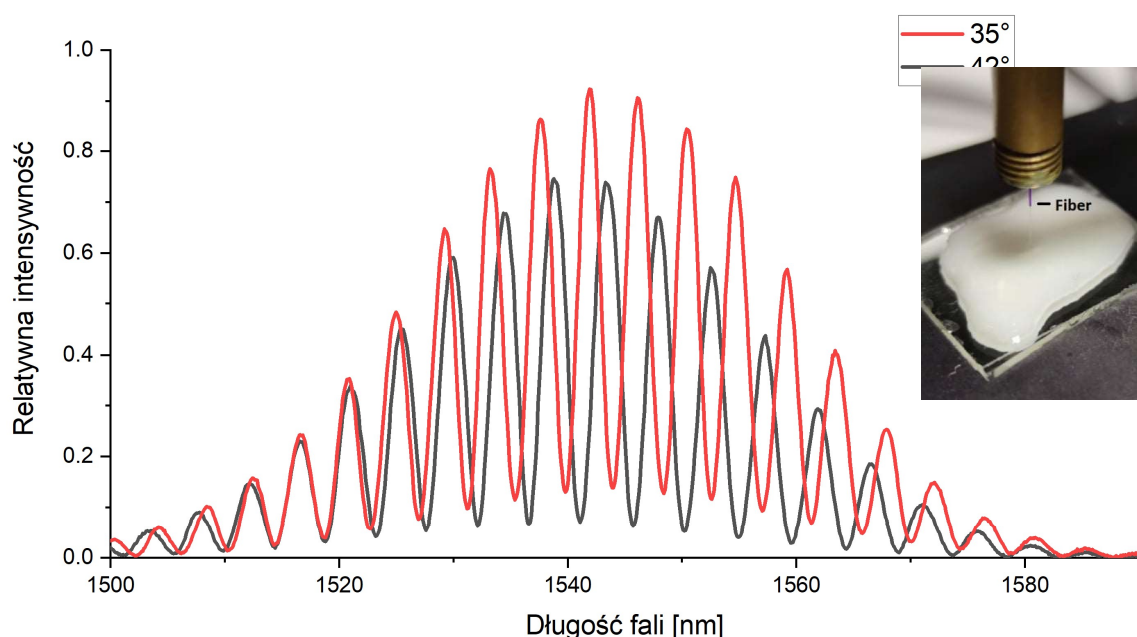
5.2 Charakterystyka zmian współczynnika załamania wybranych produktów spożywczych w funkcji temperatury

Badania rozpoczęto od analizy kurzego jaja, które dzięki obecności związków białkowych, tłuszczu, minerałów oraz wody w dużym stopniu przypomina właściwościami optycznymi tkankę biologiczną. Do badań użyto jaj typu "0", oznacza to, że kury miały dostęp do wolnego wybiegu i karmione były kaszą bez modyfikacji genetycznych. Z uwagi na niejednorodną strukturę jaja, analizie poddano oddzielnie żółto i białko. Każdorazowo aplikowano po 1 ml próbki na aluminiową szalkę. Aluminiowe podłoże zostało wybrane ze względu na dobrą przewodność cieplną oraz wystarczającą refleksyjność. W przypadku wysokiej straty sygnału spowodowanej przez straty na odbiciu wiązki, zamiast

szalki można wykorzystać zwierciadło. Należy jednak zauważyć, że takie rozwiązanie może utrudniać precyzyjną kontrolę temperatury próbki.

Pomiary wykonano w zakresie 25-47°C z krokiem co jeden stopień. Zakres ten odpowiada temperaturom występującym w tkankach biologicznych, a ponadto umożliwia monitorowanie jakości produktów spożywczych poprzez analizę warunków ich składowania. Zmiana RI pod wpływem temperatury spowodowana jest czynnikami takimi jak: zmniejszenie gęstości optycznej, głównie przez rozszerzanie cieplne, zmiany strukturalne białek oraz aminokwasów, np. poprzez denaturację i deaminację. Założono, że po upływie jednej minuty od momentu stabilizacji temperatury kontrolera, próbka osiąga temperaturę zgodną z temperaturą stolika grzewczego. Problemem przy zbyt długich pomiarach jest zmiana zawartości wody w próbce, spowodowana parowaniem, co również wpływa na RI.

Na rysunku 18 przedstawiono zarejestrowane widma dla kurzych jaj dla następujących temperatur 35°C oraz 42°C. Jako źródło wykorzystano diodę laserową o długości fali środkowej 1550 nm. Można zaobserwować zmiany związane z przesunięciem fazy, pojawiające się w zmianie odległości między prążkami (ilość prążków w widmie) oraz zmiany intensywności sygnału. Zliczając szczyty prążków w zakresie od 1520 do 1580 nm, można zaobserwować spadek liczby prążków. Dla temperatury 35°C w analizowanym zakresie występuje 14 prążków, natomiast dla temperatury 42°C występuje 13 prążków. Zmiany intensywności spowodowane są niejednorodnością badanego materiału, głównie rozmiarem cząstek oraz zmianami strukturalnymi powodowanymi wzrostem temperatury, co wpływa na tłumienność sygnału optycznego. Na podstawie zarejestrowanego widma możliwe jest określenie zespolonego współczynnika załamania, oznacza to, że widoczne zmiany w odległości między prążkami związane są ze współczynnikiem załamania (częścią rzeczywistą), natomiast zmiany intensywności widma związane są ze współczynnikiem ekstynkcji określającym absorpcję promieniowania (część urojona).



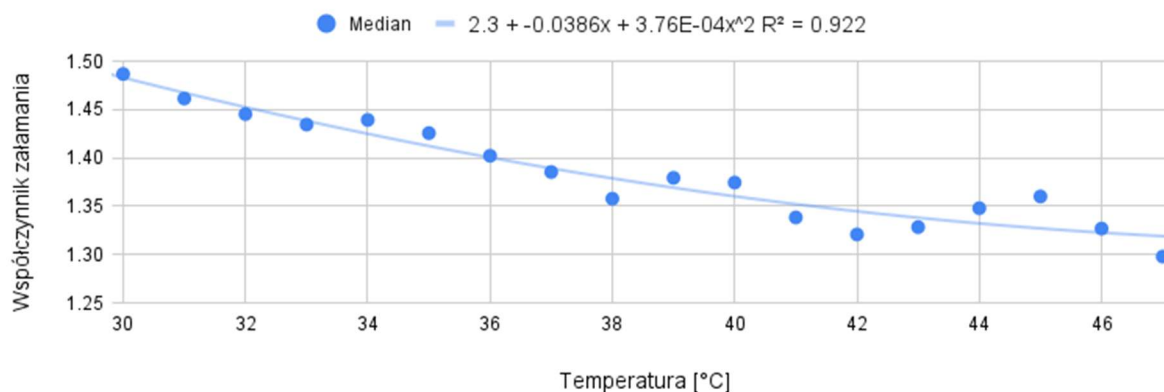
Rysunek 18. Zarejestrowane widma dla białka jaja kurzego dla dwóch wybranych temperatur w celu przedstawienia widocznych zmian

Procedura wyznaczenia RI próbki obejmowała rejestrowanie widma przy pustej wnęcie interferencyjnej, w której medium stanowiło powietrze, którego współczynnik załamania jest znany i wynosi w przybliżeniu 1,0003. Pomiar ten miał na celu określanie długości wnęki interferometru. Podczas pomiarów starano się ustawić długość wnęki na wartość bliską 200 μm , by uzyskać odpowiednią intensywność widma. Odległość ta jest adaptowana i zmieniana w zależności od długości fali środkowej wykorzystanego źródła promieniowania. Następnie do wnęki wprowadzano badaną próbkę. Poprzez zmianę medium we wnęcie zmienił się RI, co spowodowało zmianę długości drogi optycznej, czyli również widma. Następnie na podstawie zmierzonego widma oraz znanej geometrii wnęki wyznaczano współczynnik załamania światła badanego materiału. Ze wzoru:

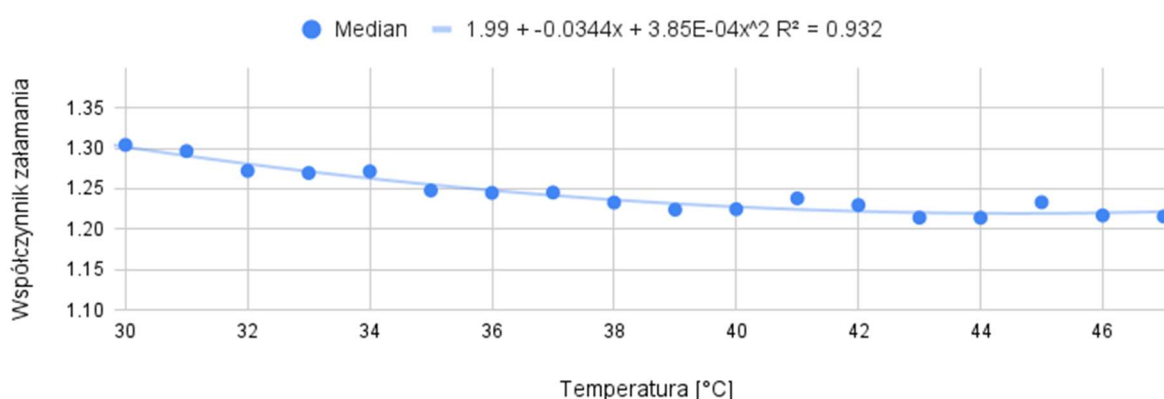
$$2 * L * RI = \lambda_0^2 / (\lambda_2 - \lambda_1) \quad (6)$$

gdzie λ_0 to środkowa długość fali źródła, λ_1 oraz λ_2 to długości fali dwóch centralnych prążków w zarejestrowanym widmie, L to długość wnęki interferometru, a RI to współczynnik załamania medium wypełniającego wnękę.

Na rysunkach 19 oraz 20 przedstawiono zależność współczynnika załamania od temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury współczynnik załamania maleje. W badanym zakresie spadek RI dla żółtka jajka wynosi średnio 0,0095/°C, dla białka 0,006/°C. Zgodnie z oczekiwaniami współczynniki załamania białka kurzego oraz żółtka różnią się. RI również różni się między poszczególnymi próbkami. Jest to między innymi spowodowane wiekiem jajka, sposobem przechowywania, stanem zdrowia kury, jej dietą oraz wiekiem. Współczynnik załamania żółtka jest większy od białka, ze względu na większą koncentrację składników odżywczych [115].



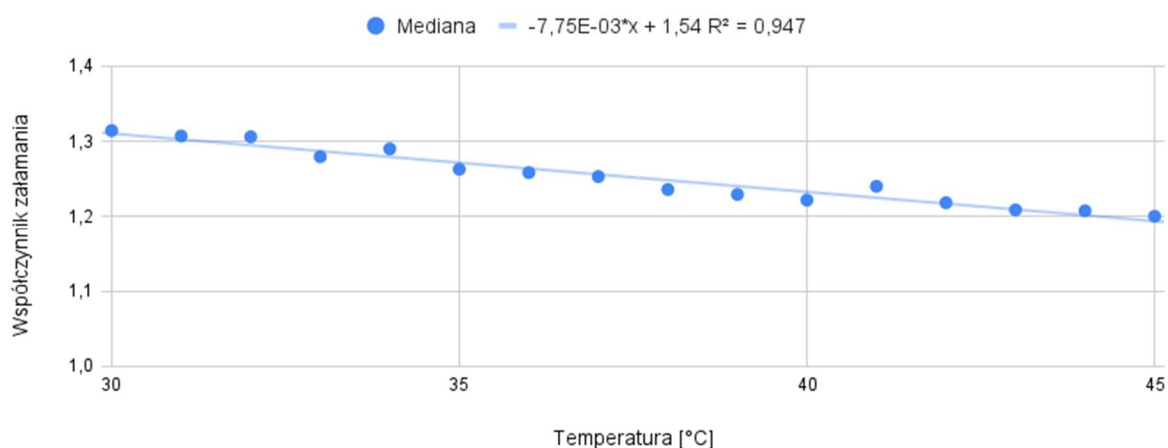
Rysunek 19. Zmiana współczynnika załamania żółtka jaja kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm



Rysunek 20. Zmiana współczynnika załamania białka jaja kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm

Uzyskany przedział wartości RI dla żółtka w zakresie 1,3 do 1,47 pokrywa zakres RI istoty szarej krowiego mózgu. Tkanka ta charakteryzuje się wysoką zawartością błon komórkowych i tłuszczu, które odwzorowuje właściwościami optycznymi kurze żółtko, które cechuje się wysoką zawartością lipidów. Współczynnik załamania istoty szarej wynosi ok 1,34 dla długości 1550 nm i temperatury 37°C [116].

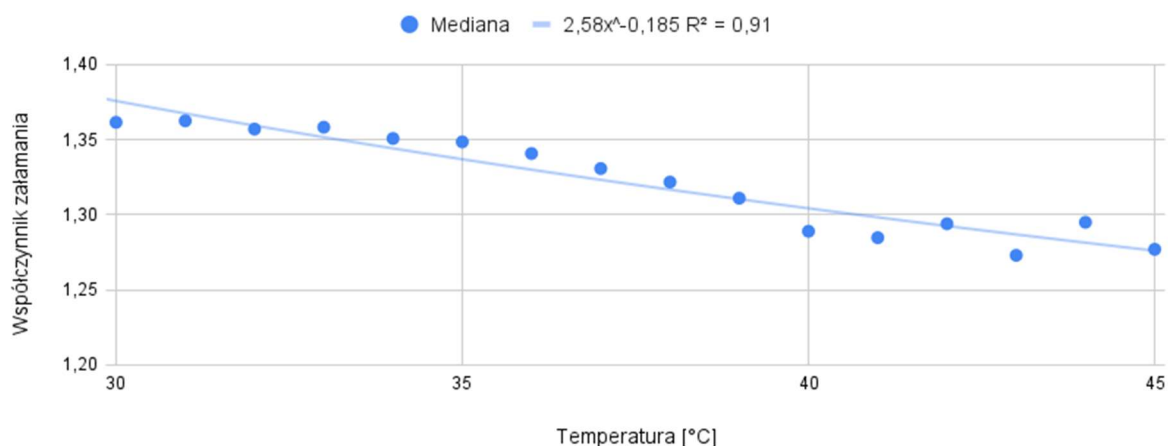
Następnie w układzie zmieniono źródło, w celu pomiaru na innych długościach fali. Zdecydowano się na źródło o długości fali środkowej 1050 nm. Badania powtórzono dla białka jaja kurzego na tej długości fali. Spadek RI w funkcji temperatury średnio wynosił 0,008/°C, jest to większa wartość niż dla długości fali 1550 nm. Na rysunku 21 wyrysowano zależność RI od temperatury dla długości fali 1050 nm. Dodatkowo zaobserwowano wyższe wartości RI względem długości fali 1550 nm dla tych samych temperatur. Jest to zgodne z oczekiwaniami, że wraz ze wzrostem długości fali maleje współczynnik załamania.



Rysunek 21. Zmiana współczynnika załamania białka kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1050 nm

Następnie przeprowadzono pomiary mleka krowiego UHT 2% tłuszczu przy użyciu tego samego układu pomiarowego i diodą laserową o długości fali środkowej 1550 nm. Mleko, ze względu na swój złożony skład obejmujący białka, tłuszcze, węglowodany i sole mineralne, również stanowi interesujący model optyczny o właściwościach zbliżonych do niektórych tkanek biologicznych. Procedura pomiarowa pozostała niezmienną, każdorazowo aplikowano 1 ml próbki na aluminiowe podłoże i rejestrowano widmo interferencyjne w wybranym zakresie temperatur. Otrzymane wyniki przedstawione na rysunku 22 pozwoliły na określenie wartości współczynnika załamania mleka oraz jego zmian w funkcji temperatury, co może mieć zastosowanie w kontroli jakości i monitorowaniu świeżości produktu. Wartość współczynnika załamania maleje zgodnie z oczekiwaniami.

Mleko UHT 2%

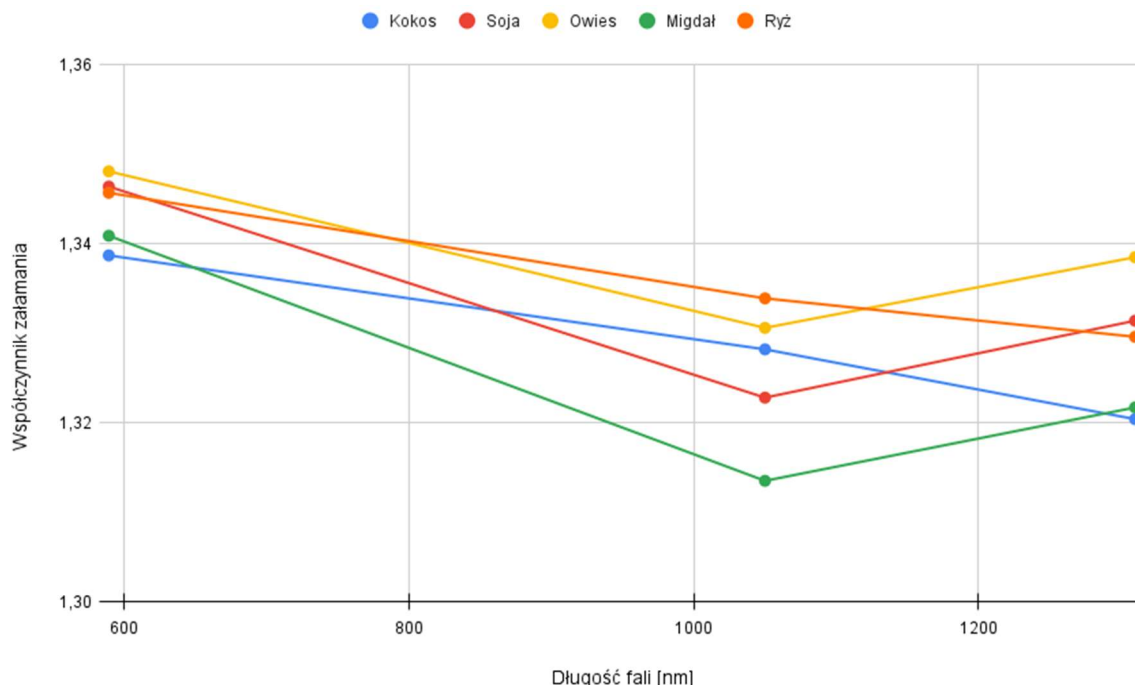


Rysunek 22. Zmiana współczynnika załamania mleka UHT 2% względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm

5.3 Badanie napojów mlecznych za pomocą refraktometru

Badania nad współczynnikami załamania produktów spożywczych wzbogacono o pomiary dla napojów roślinnych, takich jak napój sojowy, migdałowy, kokosowy, ryżowy i owsiany. Próby te miały na celu porównanie ich właściwości optycznych z mlekiem pochodzenia zwierzęcego. W porównaniu do mleka, napoje roślinne cechuje niższy współczynnik załamania. Co istotne, napoje roślinne

przebadano nie tylko w zakresie bliskiej podczerwieni (rys. 23), ale również w zakresie widzialnym (rys. 23) przy użyciu refraktometru w funkcji temperatury. Uzyskane dane mogą stanowić podstawę do przyszłych badań nad substytutami mleka w kontekście ich zastosowania jako fantomy optyczne lub próbki referencyjne w analizach metodami optycznymi.

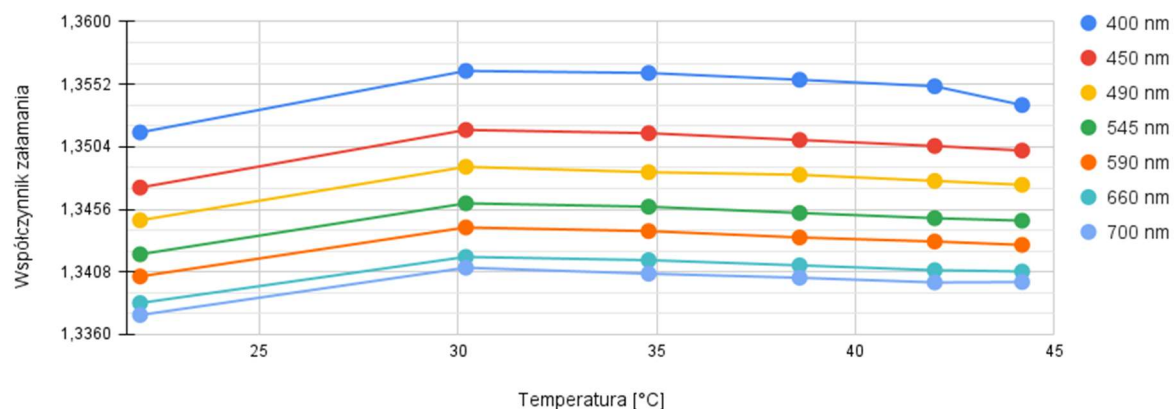


Rysunek 23. Zmiana współczynnika załamania napojów roślinnych zbadana refraktometrem dla długości fali 590 nm oraz czujnikiem niskokoherencyjnym dla długości fali 1050 nm i 1310 nm

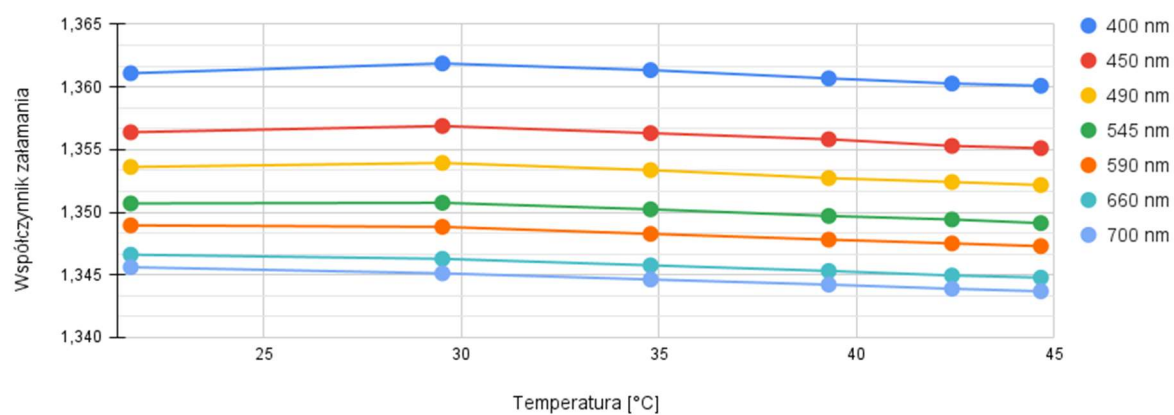
Zmiany współczynnika załamania w przypadku badanych napoi roślinnych nie są liniowe. Spodziewany spadek wartości RI wraz ze spadkiem długości fali, występuje między zakresem widzialnym, a podczerwieni dla każdego z badanych napoi. Dla napoju sojowego, owsianego i migdałowego w badanym zakresie podczerwieni 1050 nm i 1310 nm występuje wzrost RI wraz ze wzrostem długości fali.

W przypadku pomiarów w funkcji temperatury charakterystyki zmian RI różnią się dla każdego napoju jak również dla różnych długości fal. Napoje kokosowe i ryżowe charakteryzują się spadkiem RI wraz ze wzrostem temperatury, taką samą zależność obserwowano podczas pomiarów mleka krowiego UHT 2%. Dla pozostałych mlek można zaobserwować wzrost współczynnika załamania dla pomiarów do okolicy 30°C, następnie spadek współczynnika załamania wraz ze wzrostem temperatury. Zależność ta jest szczególnie widoczna dla niższych długości fali. Na rys 24. przedstawiono wyniki pomiarów charakterystyki zmian współczynnika załamania w funkcji temperatury w zakresie widzialnym. Pomiar przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu refraktometru.

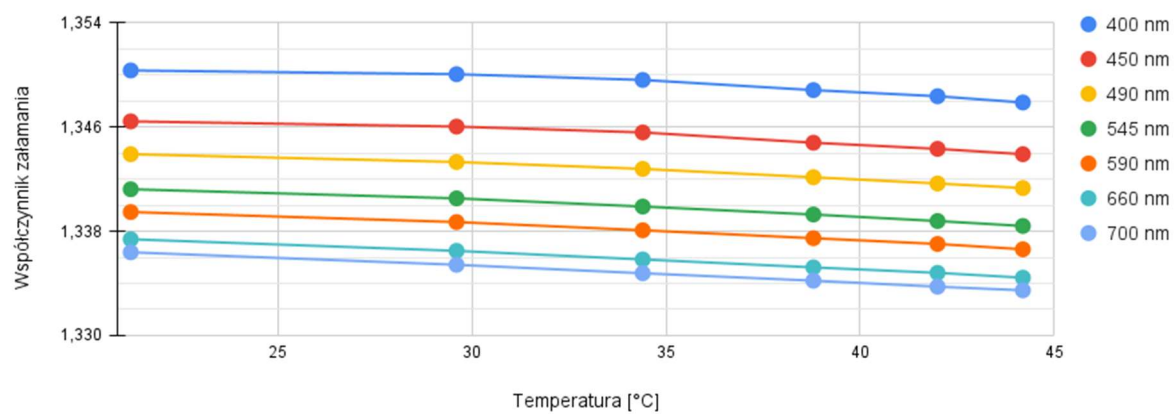
Migdał



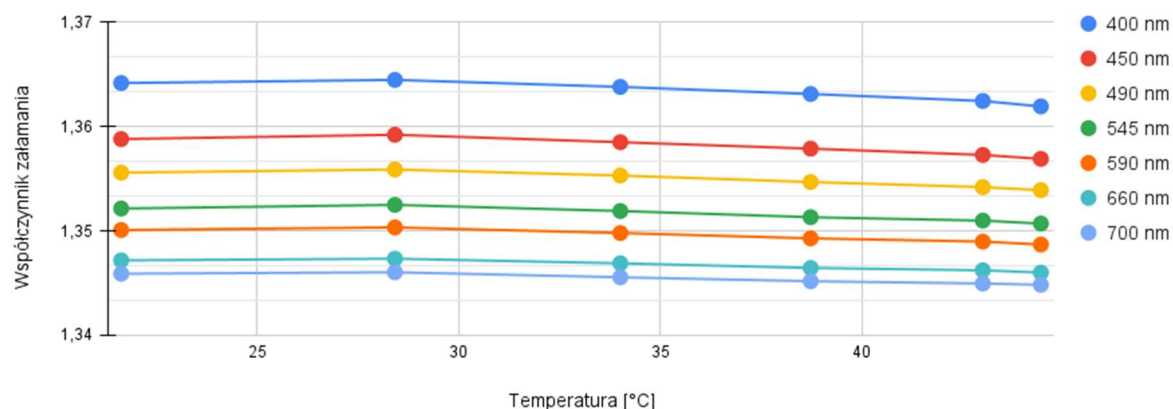
Owies



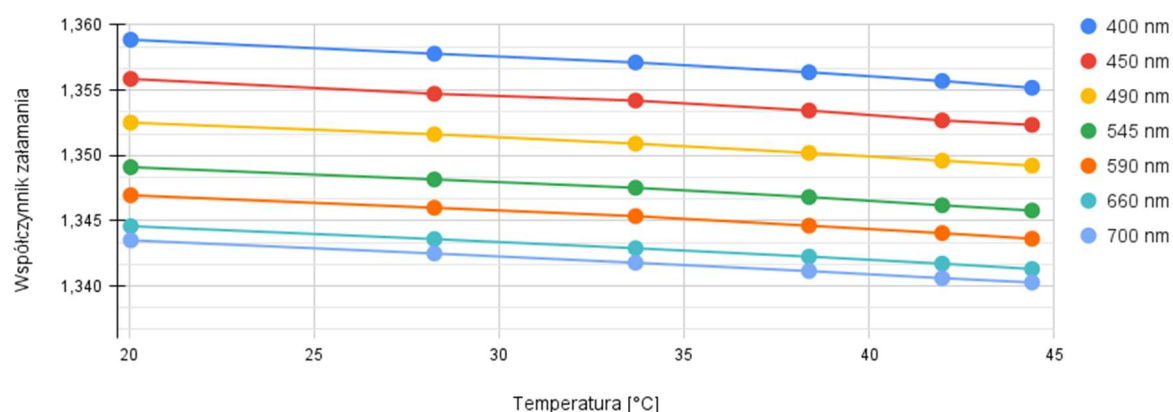
Kokos



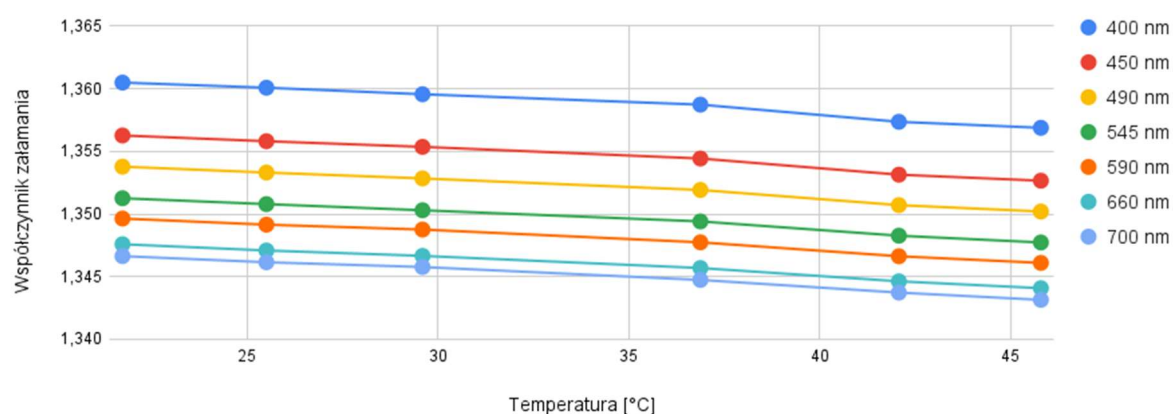
Soja



Ryż



Mleko krowie



Rysunek 24. Zmiana współczynnika załamania napojów roślinnych oraz mleka UHT 2% w funkcji zmiany temperatury dla długości fali w zakresie widzialnym

Podsumowując, celem przeprowadzania pomiarów optycznych produktów spożywczych jest wykazanie możliwości zastosowania światłowodowego interferometru w konfiguracji Fabry'ego-Perota do monitorowania zmian RI w próbkach charakteryzujących się właściwościami optycznymi zbliżonymi do tkanek biologicznych. W rozdziale opisano światłowodowy interferometr typu Fabry'ego-Perota, w którym głowicą pomiarową był prostopadle ucięty światłowod tworzący wnękę interferencyjną w wolnej przestrzeni ze zwierciadłem. Parametry techniczne metody przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody z światłowodowym czujnikiem do pomiarów zmian współczynnika RI w produktach spożywczych

Metoda	Światłowodowy interferometr typu Fabry-Perot	
Typ światłowodu	Jednomodowy	
Typy źródła	1050 nm	1550 nm
Zakres pomiarowy	1222-1422 nm z krokiem 0,1 nm	1493-1593 nm z krokiem 0,1 nm
Rozdzielczość analizatora	0,5nm (odstępna od 0,01-1 nm)	
Zakres długości fal analizatora	600-1700 nm	
Zakres dynamiki	60 dB	
Badany zakres temperaturowy	30-47°C	
Zakres pomiarowy (RI)	1,2-1,32	1,21-1,3
Średnie zmiany (RI/°C)	0,008	0,006

Zrealizowano główny cel, którym była charakteryzacja RI wybranych produktów spożywczych w bliskiej podczerwieni. Badania wypełniają część luki badawczej, wynikającej z niedostatecznej ilości danych literaturowych na temat współczynników załamania produktów spożywczych w podczerwieni. Wyniki badań posłużyły do zbadania możliwości zastosowania produktów spożywczych jako fantomy tkanek. W pracy [F] przedstawiono zarejestrowane zmiany wartości RI wywołane kontrolowaną zmianą temperatury, co umożliwiło optyczną charakterystykę jaj kurzych w zakresie długości fal bliskiej podczerwieni. Pomiar rozszerzono o pomiary RI dla długości fali 1050 nm. Dodatkowo przeprowadzono pomiar innych produktów spożywczych takich jak mleka oraz napoje roślinne. Uzyskane wyniki wskazują, że badane próbki mogą zostać wykorzystane jako fantomy tkanek biologicznych, natomiast wyznaczone charakterystyki współczynnika załamania mogą stanowić podstawę do detekcji zmian optycznych, istotnych z punktu widzenia monitorowania jakości produktów spożywczych.

6. Opracowanie i charakterystyka fantomu do walidacji optycznych metod pomiarowych

Rozdział jest wynikiem prac nad opracowaniem fantomu odzwierciedlającego widmo optyczne moczu w zakresie widzialnym [G].

Wkład doktoranta

W pracy [G] wraz z mgr. inż. Marią Babińską (równy wkład) opracowano sztuczny mocz z prostym, łatwo dostępnym składem. Powstały sztuczny mocz imituje widmo optyczne ludzkiego moczu w zakresie 200-540 nm. Opracowany fantom wykorzystany został do walidacji metod optycznych oraz do wstępnych pomiarów mających wykrywać zmiany chorobowe w moczu. W pracy [G] doktorant jest pierwszym autorem.

Aktualny stan wiedzy

Stworzenie sztucznego moczu, który wiernie odzwierciedla właściwości fizyczne oraz chemiczne prawdziwego moczu, stanowi wyzwanie badawcze. Skład moczu jest zmienny, a jego zależność od czynników takich jak wiek, płeć, dieta, stan zdrowia oraz przyjmowane leki przez pacjenta [117], utrudnia opracowanie uniwersalnego modelu. Zastosowanie fantomu zamiast próbek biologicznych podczas wstępnych pomiarów w celu walidacji metody wiąże się z brakiem konieczności wnioskowania o zgody bioetyczne. Z tego względu rośnie zainteresowanie sztucznymi odpowiednikami, które dodatkowo eliminują ryzyko związane z obecnością patogenów, pozwalają na zmiany składu w zależności od potrzeb oraz są możliwe do wykonania w laboratorium bez potrzeby pozyskania próbek od pacjentów.

Fantomy moczu znajdują zastosowanie w dziedzinie urologii, nefrologii [118,119], gdzie priorytetem jest uzyskanie składu do rozwoju patogenów lub krystalizacji materiałów w celu symulacji rozwoju kamicy nerkowej. Innymi dziedzinami są farmakologia i toksykologia [120,121], gdzie fantom moczu służy jako matryca referencyjna do badań np. na obecność narkotyków. Poszczególne modele projektowane są w zależności od potrzeb aplikacyjnych, mogą skupiać się na odwzorowaniu składu chemicznego, żeby umożliwić hodowlę bakterii [122], testowanie metod oczyszczania cewników [123], testowanie rozpuszczalności leków lub śledzenie komórek in vitro [124]. Podejmowane były już próby odwzorowania widma dla metody FTIR (spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera) [125], gdzie skupiano się na odwzorowaniu pasm absorpcyjnych konkretnych analitów. W wielu przypadkach wystarczające jest odtworzenie wybranych parametrów, na przykład pH lub właściwości optycznych. W tabeli 9 przedstawiono przykładowe sztuczne mocze dostępne do zakupu, jak również raportowane w artykułach naukowych oraz ich dedykowane zastosowania.

Tabela 9. Przykładowe sztuczne mocze wraz z ich zastosowaniami

Rodzaj	Zastosowanie	Ref.
Widmowy fantom moczu	Do badań w zakresie UV–VIS	Zaprezentowany fantom
Widmowy fantom moczu	Do badań optycznych metodą FTIR	[125]
Sztuczny mocz do hodowli kamieni nerkowych	Do badań kamicy nerkowej	[119]
Sztuczny mocz z przestrajalnym pH (BZ186)	Testy korozyjne implantów	[126]
Sztuczny mocz ISO 20696:2018 (BZ346)	Do testów cewników	[127]
Sztuczny mocz o różnych kolorach	Do sprawdzania poziomu nawodnienia	[128]
Sztuczny mocz zapobiegający wzrostowi bakterii	Do testowania sensorów	[121,129]

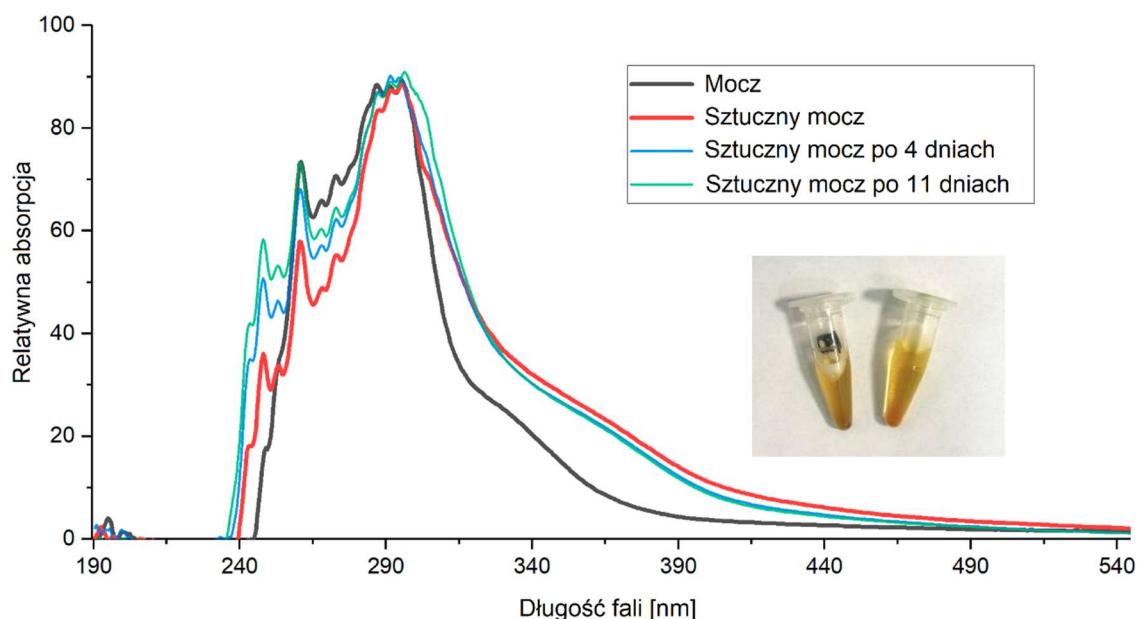
Istnieje deficyt ustandaryzowanych fantomów dedykowanych dla zakresu UV–VIS, zwłaszcza dla metod wykorzystujących spektroskopię absorpcyjną. Rozwój metod optycznych wymusza opracowanie fantomu w celu możliwości kalibracji urządzeń diagnostycznych i porównanie wyników między laboratoriami. Dlatego celem było opracowanie nowego protokołu stabilnego w czasie sztucznego moczu, który naśladuje parametry optyczne ludzkiego moczu. Skupiono się na opracowaniu fantomu imitującego właściwości absorpcyjne moczu w zakresie UV–VIS, którego brakuje na rynku.

6.1 Optyczny fantom sztucznego moczu do walidacji metod optycznych

Opracowując fantom sztucznego moczu imitującego absorpcję moczu w zakresie UV–VIS skupiono się na prostym, bezpiecznym i łatwo dostępnym składzie. Fantom można przygotować bez specjalistycznej aparatury. Do odzwierciedlenia widma wykorzystano jako bazę roztwór buforu fosforanowego (PBS) symulującego obecność soli mineralnych. Połączenie kwasu cytrynowego z acetylosalicylowym (dostępna w tabletkach typu aspiryna) wykazuje właściwości spektralnie zbliżone do kwasu moczowego. Napar z czarnej herbaty poprawił widmo dodając właściwą barwę, jak również poprzez zawartość taniny poprawił zakres UV. Opracowany model sztucznego moczu charakteryzował się barwą i wyglądem zbliżonym do naturalnego moczu, co czyni go odpowiednim do zastosowań w badaniach wizualnych oraz spektroskopowych, w których istotne jest odwzorowanie rzeczywistych właściwości próbek biologicznych.

Uzyskane widma UV–VIS, wykazały wysokie podobieństwo pomiędzy próbkami naturalnego moczu, a fantomem (rys. 25). Różnice dotyczyły jedynie intensywności sygnałów, co wynikało ze zmienności biologicznej próbek ludzkich. Zarejestrowano dobrą zgodność w zakresie 240-540 nm,

a także ogólny kształt charakterystyki spektralnej. Przeanalizowano również zmienność widma fantomu w czasie, odnotowano wzrost absorpcji w zakresie UV, prawdopodobnie powiązany z procesem utleniania się składników naparu herbacianego.



Rysunek 25. Zarejestrowane widma moczu oraz fantomów moczu, na zdjęciu po lewej w probówce mocz oraz fantom moczu po prawej

Zrealizowano cel, którym było opracowanie nowego protokołu sztucznego moczu, naśladującego parametry optyczne. Opracowanie fantomu moczu wykazało, że kluczowe właściwości optyczne cieczy biologicznych mogą być skutecznie odwzorowane przy użyciu łatwo dostępnych składników. Niska cena i łatwość odtworzenia umożliwiają szerokie zastosowanie rozwiązania w laboratoriach nieposiadających dostępu do próbek biologicznych. Zrealizowany fantom naśladuje widmo absorpcyjne w zakresie UV–VIS, takich fantomów brakuje na rynku oraz nie znalazłem protokołów w literaturze. Ponadto istnieje możliwość modyfikacji składu fantomu, co umożliwia symulację wybranych stanów patologicznych lub dostosowanie do konkretnych grup pacjentów. Wykonany fantom posłużył do walidacji poprawności działania układu ze spektrometrem.

7. Podsumowanie rozprawy i dalsze perspektywy

W rozprawie zaprezentowano wyniki badań nad materiałami do fantomów optycznych oraz zaprezentowano metody optyczne i czujnik światłowodowy do badania materiałów biologicznych. Przedstawiono opracowanie czujników światłowodowych pokrytych sfunkcjonalizowaną warstwą do detekcji RNA wirusów [A, B] oraz do detekcji przeciwciał [C]. Zaproponowano wykorzystanie technik spektroskopowych do pomiarów w płynnych próbkach biologicznych jakim są ścieki i mocz [D, E] wraz z fantomem [G]. Scharakteryzowano współczynniki załamania wybranych produktów spożywczych oraz zbadano wpływ temperatury na współczynnik załamania [F].

Osiągnięcia przedstawione w rozdziale 2 dotyczą opracowania i realizacji nowych czujników światłowodowych do zastosowań biomedycznych, co było jednym z zadań badawczych. W pracy zaprojektowano i przetestowano czujniki światłowodowe do pomiarów biomarkerów:

- W pierwszym zrealizowanym czujniku głowica pomiarowa została zmodyfikowana tworząc sferę na czole światłowodu, następnie na sferę naniesiono warstwy bioaktywne do detekcji RNA wirusa. Wykonany czujnik został przetestowany na przykładzie RNA wirusa SARS-Cov-2 umożliwiając detekcję 1 pM w PBS. Jest to wartość RNA występująca w wymazach od chorych pacjentów. Główną zaletą opracowanego czujnika jest szybki czas detekcji, nawet w ciągu 1 minuty [A], co dowodzi założonej tezie.
- W kolejnym wykonanym czujniku wykorzystano warstwę bioaktywną selektywną na detekcję RNA wirusa grypy typu A. Uzyskano limit detekcji na poziomie 0,1 fM w PBS w równie niskim czasie detekcji [B], co potwierdza założoną tezę.
- Trzeci zrealizowany czujnik światłowodowy ze zmodyfikowaną geometrycznie głowicą pokrytą warstwą bioaktywną w celu wykrywania przeciwciał przetestowano w badaniach w ściekach. Zademonstrowano działanie na przykładzie przeciwciał IgG wirusa, czujnik umożliwia pomiary stężeń 10^{-6} mg/ml do 10^{-1} mg/ml w ściekach. Czujnik umożliwia nadzór ścieków poprzez monitorowanie zmian stężenia biomarkerów [C], co dowodzi założonej tezie.

Otrzymane wyniki z trzech zaprezentowanych głowic czujników dowodzą założonej tezie, że można zrealizować czujnik światłowodowy z wykorzystaniem telekomunikacyjnego światłowodu jednomodowego, który może służyć do efektywnej detekcji wybranego biomarkera w złożonej matrycy biologicznej.

Zaprezentowano metodę optyczną wspomaganą uczeniem maszynowym do detekcji ZUM oraz urosepsy w rozdziale 3, realizując w ten sposób kolejne zadanie badawcze mające na celu implementację i adaptację istniejących metod optycznych do nowych zastosowań. Metoda nie opiera się na bezpośredniej analizie moczu pacjenta, tylko analizie metabolicznej. Próbkę zbadano w zakresie 600-750 nm, przez co metoda charakteryzuje się niskim kosztem, szybkością, łatwością miniaturyzacji oraz łatwą możliwością dalszego rozwoju w kierunku identyfikacji innych zmian chorobowych, rozszerzając analizę o inne długości fali. Szybkość pomiaru wraz z analizą jest kluczowym parametrem innowacyjności metody, dzięki czemu metoda może służyć do wspierania diagnostyki stanów

uroseptycznych. Zastosowanie algorytmów klasyfikacyjnych pozwoliło osiągnąć dokładność klasyfikacji pacjentów z urosepsą na poziomie do 97% [D].

W rozdziale 4, kontynuowano implementacje i adaptacje istniejących metod optycznych do nowych zastosowań. Przedstawiono wykorzystanie techniki spektroskopowej do nadzoru ścieków. Metoda optyczna pozwala na monitorowanie zmian stężenia biomarkerów CRP w ściekach. Badania przeprowadzono na ściekach zbieranych z okresu 3 miesięcy, analiza z wykorzystaniem algorytmów uczenia maszynowego wykazała możliwość ustalania wartości dla wczesnego ostrzegania epidemiologicznego. Dla testowanej wartości 10^{-4} µg/mL CRP w ściekach algorytm wykrywał przekroczenie stężenia z dokładnością do 68,1% [E].

Przegląd literatury w rozdziale 5 wskazał brak danych lub niewystarczającą ilość informacji na temat parametrów optycznych produktów spożywczych takich jak kurze jaja i mleko. Przedstawione zostały badania nad wpływem temperatury na RI wybranych produktów spożywczych takich jak jaja [G], mleko i napoje roślinne. Pomiary wykonano czujnikiem światłowodowym, dostosowanym do pomiarów RI próbek biologicznych. Wyniki wykazały, że RI maleje wraz ze wzrostem temperatury. Zmiany te mogą być korzystne w przypadku tworzenia fantomu imitującego właściwości optyczne tkanek biologicznych. Dodatkowo wyniki badań mogą posłużyć do monitorowania zmian w żywności, np. powiązanych z zachodzeniem reakcji związanych z zepsuciem poprzez monitorowanie zmian RI.

Ostatnim zadaniem badawczym było opracowanie protokołu fantomu, który odzwierciedla właściwości optyczne cieczy ustrojowych. W pracy opisano opracowanie sztucznego moczu złożonego z czterech łatwo dostępnych składników: roztworu PBS, kwasu cytrynowego, tabletki aspiryny i naparu z czarnej herbaty. Celem roztworu było uzyskanie widma UV–VIS podobnego do ludzkiego moczu. Poprzez zmianę proporcji oraz dodanie nowych składników, możliwe jest imitowanie zmian w widmie związanych ze zmianami chorobowymi pacjentów. Opracowany fantom pozwala na testowanie metod spektroskopowych i czujników w warunkach laboratoryjnych bez konieczności użycia materiału biologicznego, co zwiększa bezpieczeństwo pracy w laboratorium [G].

7.1 Osiągnięcia naukowe doktoranta

Rezultatem prac badawczych są publikacje wyników badań w licznych artykułach w recenzowanych czasopiśmie naukowych. Wyniki zaprezentowano również na wielu międzynarodowych konferencjach naukowych. Z najważniejszych osiągnięć doktorant wskazuje:

- Publikacje 10 artykułów, z czego 8 z listy JCR (3 jako pierwszy autor). 7 artykułów zostało w całości załączonych do rozprawy.
- Współautorstwo przy składaniu patentów:
 - EP4537084A1 “A Method of discriminating urinary tract infections”,
 - PL445690A1 “Układ do wykrywania białka w próbce materiału biologicznego w postaci płynnej i sposób do wykrywania białka realizowany za pomocą tego układu”.
- Praca w projektach naukowych związanymi z grantami polskimi:
 - Nauka dla Społeczeństwa w czasie występowania zagrożeń epidemiologicznych [NdS/551425/2022/2022] finansowanymi przez MNiSW,

- Technetium Talent Management Grants „Badanie parametrów optycznych tkanek biologicznych i fantomów tkanek w funkcji temperatury”, kierownik prof. Małgorzata Szczerska [25/2022/IDUB/III.4.1/Tc],
- Technetium Talent Management Grants „Biofotoniczny czujnik do badań przesiewowych w celu wykrycia biomarkerów urosepsy”, kierownik prof. Małgorzata Szczerska [14/1/2024/IDUB/III.4c/Tc],
- Technetium Talent Management Grants „Interferometr światłowodowy jako czujnik interakcji powierzchni trybologicznej i tkanki biologicznej”, kierownik prof. Małgorzata Szczerska [7/1/2024/IDUB/III.4c/Tc],
- Plutonium Supporting Student Research Teams „Modyfikowane biochemicznie czujniki światłowodowe do wykrywania białka w sztucznym moczu”, kierownik prof. Małgorzata Szczerska [1/2020/IDUB/III.4.3/Pu].
- Praca w projektach naukowych związanych z grantami międzynarodowymi:
 - COST (Europejski Program Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych) CA 21159 - Understanding interaction light - biological surfaces: possibility for new electronic materials and devices (PhoBioS).
- Stypendysta w projekcie OPUS 23 „Przetwarzanie wtórnych materiałów odpadowych w zoptymalizowane topologicznie hierarchicznie porowate kompozyty w celu dostosowania ścieżki degradacji elektrochemicznej trwałych zanieczyszczeń organicznych”, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, kierownik dr Mattia Pierpaoli.
- Liczne prezentacje na konferencjach naukowych oraz zdobycie dwóch nagród za najlepszą prezentację plakatową:
 - Biosensors, 2025, Portugalia
 - Advances in 3OM, 2024, Rumunia
- Działalność popularnonaukowa poprzez organizację warsztatów w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki, Nocy Naukowców, Dni Otwartych PG.
- Wsparcie merytoryczne studentów, jako konsultant techniczny projektów inżynierskich i magisterskich.
- Zaangażowanie w kołach naukowych „Optica” i „Biophoton”.

7.2 Dalsze plany badawcze

Dalsze plany obejmować będą głównie kontynuacje nad zaprezentowanymi czujnikami światłowodowymi oraz fantomami optycznymi. W przypadku czujników światłowodowych należy przeprowadzić więcej testów w różnych warunkach środowiskowych w celu określenia trwałości czujnika oraz powtarzalność pomiarów w czasie. Następnie należy zaimplementować sensor w pomiarach w warunkach poza laboratorium, np. w pomiarach w ściekach lub w urządzeniach medycznych.

Kolejnym obszarem są prace nad pokryciem zaproponowanego typu czujnika kolejnymi warstwami na inne wirusy, co aktualnie jest realizowane. W celu zaproponowania kolejnej metody diagnostycznej

trwają badania nad detekcją kolejnych biomarkerów, jak również nad ulepszeniem warstwy bioaktywnej, zwiększając jej stabilność i powtarzalność.

Zaprezentowany fantom sztucznego moczu nadal będzie rozwijany do badań na obecność markerów chorobowych. Planowane są badania dla konkretnych scenariuszy diagnostycznych poprzez dodawanie różnych biomarkerów do zaproponowanego fantomu.

Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat głowicy światłowodowego czujnika z zaznaczeniem kluczowych wiązek dla zjawiska interferencji otrzymanej w rejestrowanym widmie	16
Rysunek 2. Schemat metody pomiarowej czujnika światłowodowego do badań biomarkerów	16
Rysunek 3. Schemat realizacji czujnika. Wykonanie mikrosfery na czole światłowodu, następnie przygotowanie warstwy adhezyjnej. Przyłączenie sond do identyfikacji biomarkerów	17
Rysunek 4. Zarejestrowane zmiany widma podczas nakładania kolejnych warstw na głowice światłowodu	19
Rysunek 5. Zarejestrowane widmo roztworu referencyjnego PBS oraz roztworu pomiarowego z RNA wirusa w PBS. Głowica pomiarowa zanurzona była na 1 minutę oraz 10 minut w roztworze pomiarowym	20
Rysunek 6. Zarejestrowane widma roztworu referencyjnego PBS zaznaczonego na czarno oraz trzech stężeń DNA imitującego RNA wirusa w PBS	21
Rysunek 7. Zmiana intensywności widma w funkcji stężenia badanego RNA. A) reprezentacja stężeń w skali logarytmicznej, do aproksymacji krzywej nasycenia, B) reprezentacja stężeń w skali liniowej	22
Rysunek 8. Zmiana intensywności widma w funkcji czasu. Kolorem czarnym pomiary referencyjne, następnie na pomarańczowo stężenie 0,1 fM DNA w PBS, na zielono stężenie 1 fM, a czerwono 10 fM.	22
Rysunek 9. Widma optyczne zarejestrowane dla różnych stężeń przeciwciał w ściekach. Wykres wykonany przez dr. inż. Monikę Kosowską	23
Rysunek 10. Schemat kroków metody pomiarowej w celu klasyfikacji próbek	30
Rysunek 11. Zarejestrowane zmiany absorpcji względem wody, dla próbek od pacjentów z ZUM oraz urosepsą	31
Rysunek 12. Schemat badań mających na celu monitorowanie stężenia CRP w ściekach	34
Rysunek 13. Uśrednione widmo optyczne zebranych ścieków wraz z zakresem zmian widma	35
Rysunek 14. Schemat prototypowego układu do nadzoru ścieków w rurze kanalizacyjnej	37
Rysunek 15. Zrealizowany układ monitorowania ścieków a) w kostce, b) w rurze imitującej przewód kanalizacyjny, c) pomiary intensywności sygnału dla źródła 470 nm, d) pomiary intensywności sygnału dla źródła 533 nm, e) pomiary intensywności sygnału dla źródła 635 nm	39
Rysunek 16. Schemat przedstawiający wpływ zmiany współczynnika załamania wewnątrz wnęki w niskokoherencyjnym interferencyjnym światłowodowym czujniku Fabry'ego-Perota na otrzymany sygnał pomiarowy. a) wnęka wypełniona powietrzem $RI \approx 1$, b) wnęka wypełniona próbką o $RI > 1$, powoduje to zmianę długości drogi optycznej, co objawia się w zmianie fazy, widocznej w zmianie odległości między rejestrowanymi prążkami Δx	45
Rysunek 17. Schemat układu pomiarowego do badania wpływu temperatury na zmiany RI próbek biologicznych. 1-światłowod, 2-próbka, 3-szalka aluminiowa, 4-płyta grzewcza	46
Rysunek 18. Zarejestrowane widma dla białka jaja kurzego dla dwóch wybranych temperatur w celu przedstawienia widocznych zmian	48

Rysunek 19. Zmiana współczynnika załamania żółtka jaja kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm	49
Rysunek 20. Zmiana współczynnika załamania białka jaja kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm	49
Rysunek 21. Zmiana współczynnika załamania białka kurzego względem zmiany temperatury dla długości fali 1050 nm	50
Rysunek 22. Zmiana współczynnika załamania mleka UHT 2% względem zmiany temperatury dla długości fali 1550 nm	50
Rysunek 23. Zmiana współczynnika załamania napojów roślinnych zbadana refraktometrem dla długości fali 590 nm oraz czujnikiem niskokoherencyjnym dla długości fali 1050 nm i 1310 nm	51
Rysunek 24. Zmiana współczynnika załamania napojów roślinnych oraz mleka UHT 2% w funkcji zmiany temperatury dla długości fali w zakresie widzialnym	53
Rysunek 25. Zarejestrowane widma moczu oraz fantomów moczu, na zdjęciu po lewej w probówce mocz oraz fantom moczu po prawej	57

Spis tabel

Tabela 1. Porównanie wybranych metod detekcji biomarkerów, na przykładzie RNA i DNA	14
Tabela 2. Wybrane parametry techniczne zrealizowanych czujników światłowodowych	24
Tabela 3. Porównanie wybranych parametrów metod diagnostyki wystąpienia sepsy	27
Tabela 4. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody optycznej z klasyfikacją próbek	32
Tabela 5. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody nadzoru w ściekach	36
Tabela 6. Zestawienie zmian parametrów absorbancji dla wybranych długości fali	40
Tabela 7. Współczynniki załamania wybranych produktów spożywczych	42
Tabela 8. Parametry metrologiczne zaprezentowanej metody z światłowodowym czujnikiem do pomiarów zmian współczynnika RI w produktach spożywczych	54
Tabela 9. Przykładowe sztuczne mocze wraz z ich zastosowaniami	56

Bibliografia

1. Handbook of Coherent Domain Optical Methods. *Handbook of Coherent Domain Optical Methods* 2004, doi:10.1007/0-387-29989-0.
2. Wang, L. V.; Hsin-I Wu Biomedical Optics: Principles and Imaging. *Biomedical Optics: Principles and Imaging* 2012, doi:10.1002/9780470177013.
3. Pires, N.M.M.; Dong, T.; Hanke, U.; Hoivik, N. Recent Developments in Optical Detection Technologies in Lab-on-a-Chip Devices for Biosensing Applications. *Sensors* 2014, Vol. 14, Pages 15458-15479 2014, 14, 15458–15479, doi:10.3390/S140815458.
4. Pospíšilová, M.; Kuncová, G.; Trögl, J. Fiber-Optic Chemical Sensors and Fiber-Optic Bio-Sensors. *Sensors* 2015, Vol. 15, Pages 25208-25259 2015, 15, 25208–25259, doi:10.3390/S151025208.
5. Zhang, X.; Zhu, H.; Jiang, X.; Broere, W. Distributed Fiber Optic Sensors for Tunnel Monitoring: A State-of-the-Art Review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering* 2024, 16, 3841–3863, doi:10.1016/J.JRMGE.2024.01.008.
6. Villar, I. Del; Matias, I.R. Optical Fibre Sensors: Fundamentals for Development of Optimized Devices. *Optical Fibre Sensors: Fundamentals for Development of Optimized Devices* 2020, 1–520, doi:10.1002/9781119534730;
7. Weiner, J.; Ho, P. -T. Absorption and Emission of Radiation. *Light—Matter Interaction* 2003, 1–18, doi:10.1002/9783527617883.CH1.
8. Tkachenko, N. V. Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentations. *Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentations* 2006, 1–307, doi:10.1016/B978-0-444-52126-2.X5024-2.
9. Jurina, T.; Cvetnić, T.S.; Šalić, A.; Benković, M.; Valinger, D.; Kljusurić, J.G.; Zelić, B.; Jurinjak Tušek, A. Application of Spectroscopy Techniques for Monitoring (Bio)Catalytic Processes in Continuously Operated Microreactor Systems. *Catalysts* 2023, Vol. 13, Page 690 2023, 13, 690, doi:10.3390/CATAL13040690.
10. Goldschmidt, J.; Nitzsche, L.; Wolf, S.; Lambrecht, A.; Wöllenstein, J. Rapid Quantitative Analysis of IR Absorption Spectra for Trace Gas Detection by Artificial Neural Networks Trained with Synthetic Data. *Sensors* 2022, Vol. 22, Page 857 2022, 22, 857, doi:10.3390/S22030857.
11. Larson, N.R.; Wei, Y.; Middaugh, C.R. Label-Free, Direct Measurement of Protein Concentrations in Turbid Solutions with a UV-Visible Integrating Cavity Absorbance Spectrometer. *Anal Chem* 2018, 90, 4982–4986, doi:https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00502.
12. Leme, J.; Fernández Núñez, E.G.; de Almeida Parizotto, L.; Chagas, W.A.; dos Santos, E.S.; Caricati, A.T.P.; de Rezende, A.G.; da Costa, B.L.V.; Monteiro, D.C.V.; Boldorini, V.L.L.; et al. A Multivariate Calibration Procedure for UV/VIS Spectrometric Monitoring of BHK-21 Cell Metabolism and Growth. *Biotechnol Prog* 2014, 30, 241–248, doi:10.1002/BTPR.1847.
13. Febrianti, N.Q.; Tunggeng, M.G.R.; Ramadhany, I.D.; Asri, R.M.; Djabir, Y.Y.; Permana, A.D. Validation of UV–Vis Spectrophotometric and Colorimetric Methods to Quantify Methotrexate in Plasma and Rat Skin Tissue: Application to in Vitro Release, Ex Vivo and in Vivo Studies from Dissolving Microarray Patch Loaded PH-Sensitive Nanoparticle. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2024, 315, 124258, doi:10.1016/J.SAA.2024.124258.

14. Brown, J.Q.; Vishwanath, K.; Palmer, G.M.; Ramanujam, N. Advances in Quantitative UV–Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-Clinical Application in Cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20, 119–131, doi:10.1016/J.COPBIO.2009.02.004.
15. Ozaki, Y.; Morisawa, Y.; Ikehata, A.; Higashi, N. Far-Ultraviolet Spectroscopy in the Solid and Liquid States: A Review. *Appl Spectrosc* 2012, 66, 1–25, doi:10.1366/11-06496/ASSET/5EF5F4C8-7AEB-441C-B69A-97508CB25C66/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1366_11-06496-FIG30.JPG.
16. Zimmermann, P.; Peredkov, S.; Abdala, P.M.; DeBeer, S.; Tromp, M.; Müller, C.; van Bokhoven, J.A. Modern X-Ray Spectroscopy: XAS and XES in the Laboratory. *Coord Chem Rev* 2020, 423, 213466, doi:10.1016/J.CCR.2020.213466.
17. Bender, J.E.; Shang, A.B.; Moretti, E.W.; Yu, B.; Richards, L.M.; Ramanujam, N.; Thibodeau, G.A.; Patton, K.T. Noninvasive Monitoring of Tissue Hemoglobin Using UV-VIS Diffuse Reflectance Spectroscopy: A Pilot Study. *Optics Express*, Vol. 17, Issue 26, pp. 23396-23409 2009, 17, 23396–23409, doi:10.1364/OE.17.023396.
18. Shishov, A.; Krekhova, F.; Bulatov, A. Deep Eutectic Solvent Based on Thymol and Menthol for Microextraction and Sensitive UV-Vis Determination of Total Selenium in Eggs and Chicken Tissue. *Journal of Food Composition and Analysis* 2024, 126, 105875, doi:10.1016/J.JFCA.2023.105875.
19. Brown, J.Q.; Vishwanath, K.; Palmer, G.M.; Ramanujam, N. Advances in Quantitative UV-Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-Clinical Application in Cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20, 119, doi:10.1016/J.COPBIO.2009.02.004.
20. Jung, N.; Kim, C.; Kim, H.; Seo, Y.; Hwang, J.; Yang, M.; Ahn, S.Y.; Sung, S.I.; Chang, Y.S. Changes to Blood-Sampling Protocol to Reduce the Sampling Amount in Neonatal Intensive Care Units: A Quality Improvement Project. *J Clin Med* 2023, 12, 5712, doi:10.3390/JCM12175712.
21. Eubank, T.A.; Long, S.W.; Perez, K.K. Role of Rapid Diagnostics in Diagnosis and Management of Patients With Sepsis. *J Infect Dis* 2020, 222, S103–S109, doi:10.1093/INFDIS/JIAA263.
22. Nayak, S.; Blumenfeld, N.R.; Laksanasopin, T.; Sia, S.K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. *Anal Chem* 2017, 89, 102–123, doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04630.
23. Jaswal, P.; Kanwar, A.; Thakur, A.; Sofi, Z.A.; Sahil; Rana, S.; Akash Advances in Non-Invasive Urinalysis Techniques for Monitoring Health and Detecting Disorders: A Review. *2023 10th IEEE Uttar Pradesh Section International Conference on Electrical, Electronics and Computer Engineering, UPCON 2023* 2023, 1209–1216, doi:10.1109/UPCON59197.2023.10434708.
24. Echeverry, G.; Hortin, G.L.; Rai, A.J. Introduction to Urinalysis: Historical Perspectives and Clinical Application. *Methods Mol Biol* 2010, 641, 1–12, doi:10.1007/978-1-60761-711-2_1.
25. Choi, P.M.; Tschärke, B.J.; Donner, E.; O'Brien, J.W.; Grant, S.C.; Kaserzon, S.L.; Mackie, R.; O'Malley, E.; Crosbie, N.D.; Thomas, K. V.; et al. Wastewater-Based Epidemiology Biomarkers: Past, Present and Future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018, 105, 453–469, doi:10.1016/J.TRAC.2018.06.004.
26. Park, J.; Kim, J.A.; Ahn, H.; Bae, J.; Jin, J. A Review of Thickness Measurements of Thick Transparent Layers Using Optical Interferometry. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 2019, 20, 463–477, doi:10.1007/S12541-019-00105-0/FIGURES/11.

27. Karpienko, K.; Wróbel, M.S.; Jędrzejewska-Szczerska, M. Determination of Refractive Index Dispersion Using Fiber-Optic Low-Coherence Fabry–Perot Interferometer: Implementation and Validation. 2014, *53*, 077103, doi:10.1117/1.OE.53.7.077103.
28. Zhernovaya, O.; Sydoruk, O.; Tuchin, V.; Douplik, A. The Refractive Index of Human Hemoglobin in the Visible Range. *Phys Med Biol* 2011, *56*, 4013, doi:10.1088/0031-9155/56/13/017.
29. Wang, Z.; Popescu, G.; Tangella, K. V.; Balla, A. Tissue Refractive Index as Marker of Disease. *J Biomed Opt* 2011, *16*, 116017, doi:10.1117/1.3656732.
30. Kwon, I.H.; Kim, H.S.; Kim, D.Y.; Lee, H.J.; Lee, S.W. Utilizing Optical Phantoms for Biomedical-Optics Technology: Recent Advances and Challenges. *Current Optics and Photonics* 2024, *8*, 327–344, doi:10.3807/COPP.2024.8.4.327.
31. Liao, J.C.; Smith, G.T.; Zlatev, D. V.; Bowden, A.K.E.; Lurie, K.L. Multimodal 3D Cancer-Mimicking Optical Phantom. *Biomedical Optics Express*, Vol. 7, Issue 2, pp. 648–662 2016, *7*, 648–662, doi:10.1364/BOE.7.000648.
32. Pogue, B.W.; Patterson, M.S. Review of Tissue Simulating Phantoms for Optical Spectroscopy, Imaging and Dosimetry. *J Biomed Opt* 2006, *11*, 041102, doi:10.1117/1.2335429.
33. Tombuloglu, H.; Sabit, H.; Al-Khallaf, H.; Kabanja, J.H.; Alsaeed, M.; Al-Saleh, N.; Al-Suhaimi, E. Multiplex Real-Time RT-PCR Method for the Diagnosis of SARS-CoV-2 by Targeting Viral N, RdRP and Human RP Genes. *Sci Rep* 2022, *12*, doi:10.1038/S41598-022-06977-Z.
34. Lin, Y.; Zheng, D.; Ran, C. A New Method for Scour Monitoring Based on Distributed Fiber Optic Vibration Sensing. *Measurement* 2025, *253*, 117448, doi:10.1016/J.MEASUREMENT.2025.117448.
35. Lyu, S.; Wu, Z.; Shi, X.; Wu, Q.; Lyu, S.; Wu, Z.; Shi, X.; Wu, Q. Optical Fiber Biosensors for Protein Detection: A Review. *Photonics* 2022, Vol. 9, 2022, *9*, doi:10.3390/PHOTONICS9120987.
36. Leitaó, C.; Pereira, S.O.; Alberto, N.; Lobry, M.; Loyez, M.; Costa, F.M.; Pinto, J.L.; Caucheteur, C.; Marques, C. Cortisol In-Fiber Ultrasensitive Plasmonic Immunosensing. *IEEE Sens J* 2021, *21*, 3028–3034, doi:10.1109/JSEN.2020.3025456.
37. Amjad, A.; Xian, X. Optical Sensors for Transdermal Biomarker Detection: A Review. *Biosens Bioelectron* 2025, *267*, 116844, doi:10.1016/J.BIOS.2024.116844.
38. Han, X.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Song, Q.; Hasi, W.; Lin, S.; Wang, F. A Temperature Compensated Fiber Probe for Highly Sensitive Detection in Virus Gene Biosensing. *Anal Chim Acta* 2024, *1316*, 342820, doi:10.1016/J.ACA.2024.342820.
39. Li, J.; Huang, Y.; Gao, S.; Jin, L.; Guan, B.-O.; Sun, L.-P.; Ran, Y. High-Sensitivity DNA Biosensor Based on Microfiber Sagnac Interferometer. *Optics Express*, Vol. 25, Issue 12, pp. 13305–13313 2017, *25*, 13305–13313, doi:10.1364/OE.25.013305.
40. Bratash, O.; Buhot, A.; Leroy, L.; Engel, E. Optical Fiber Biosensors toward in Vivo Detection. *Biosens Bioelectron* 2024, *251*, 116088, doi:10.1016/J.BIOS.2024.116088.
41. Shen, C.; Huang, Z.; Chen, X.; Wang, Z.; Zhou, J.; Wang, Z.; Liu, D.; Li, C.; Zhao, T.; Zhang, Y.; et al. Rapid Ultra-Sensitive Nucleic Acid Detection Using Plasmonic Fiber-Optic Spectral Combs and Gold Nanoparticle-Tagged Targets. *Biosens Bioelectron* 2023, *242*, doi:10.1016/j.bios.2023.115719.
42. Peng, G.D. *Handbook of Optical Fibers*; Springer Singapore, 2019; ISBN 9789811070877.

43. Ziemann, O.; Krauser, J.; Zamzow, P.E.; Daum, W. POF Handbook: Optical Short Range Transmission Systems. *POF Handbook: Optical Short Range Transmission Systems*, Wiley 2008, 1–886, doi:10.1007/978-3-540-76629-2.
44. Sokołowski, P.; Łubiński, J.; Wierzba, P.; Czubek, J.; Miluski, P.; Janiak, F.; Guan, S.; Szczerska, M. Polymer Materials for U-Shaped Optic Fiber Sensors: A Review. *Photonics* 2025, Vol. 12, Page 56 2025, 12, 56, doi:10.3390/PHOTONICS12010056.
45. Ma, S.; Xu, Y.; Pang, Y.; Zhao, X.; Li, Y.; Qin, Z.; Liu, Z.; Lu, P.; Bao, X. Optical Fiber Sensors for High-Temperature Monitoring: A Review. *Sensors* 2022, Vol. 22, Page 5722 2022, 22, 5722, doi:10.3390/S22155722.
46. Zainuddin, N.H.; Chee, H.Y.; Ahmad, M.Z.; Mahdi, M.A.; Abu Bakar, M.H.; Yaacob, M.H. Sensitive Leptospira DNA Detection Using Tapered Optical Fiber Sensor. *J Biophotonics* 2018, 11, doi:10.1002/JBIO.201700363.
47. Khozayemeh, F.; Melli, F.; Capodaglio, S.; Corradini, R.; Benabid, F.; Vincetti, L.; Cucinotta, A. Hollow-Core Fiber-Based Biosensor: A Platform for Lab-in-Fiber Optical Biosensors for DNA Detection. *Sensors* 2022, Vol. 22, Page 5144 2022, 22, 5144, doi:10.3390/S22145144.
48. Hu, X. guang; Zhao, Y.; Peng, Y.; Chen, X. ming; Wang, L. feng; Lin, Z. ting; Zhao, J.; Hu, S. In-Situ Label-Free Temperature-Compensated DNA Hybridization Detection with a Fiber-Optic Interferometer and a Fiber Bragg Grating for Microfluidic Chip. *Biosens Bioelectron* 2023, 242, 115703, doi:10.1016/J.BIOS.2023.115703.
49. Peng, Y.; Pan, Y.; Sun, Z.; Li, J.; Yi, Y.; Yang, J.; Li, G. An Electrochemical Biosensor for Sensitive Analysis of the SARS-CoV-2 RNA. *Biosens Bioelectron* 2021, 186, 113309, doi:10.1016/J.BIOS.2021.113309.
50. Chang, S.S.; Hsieh, W.H.; Liu, T.S.; Lee, S.H.; Wang, C.H.; Chou, H.C.; Yeo, Y.H.; Tseng, C.P.; Lee, C.C. Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis – A Systemic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2013, 8, e62323, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0062323.
51. Spackman, E.; Suarez, D.L. Type A Influenza Virus Detection and Quantitation by Real-Time RT-PCR. *Methods in Molecular Biology* 2008, 436, 19–26, doi:10.1007/978-1-59745-279-3_4.
52. Corning SMF-28 Product Information Available online: (<https://www.corning.com/media/worldwide/coc/documents/Fiber/product-information-sheets/PI-1424-AEN.pdf>) (accessed on 7 February 2023).
53. Rajibul Islam, M.; Mahmood Ali, M.; Lai, M.H.; Lim, K.S.; Ahmad, H. Chronology of Fabry-Perot Interferometer Fiber-Optic Sensors and Their Applications: A Review. *Sensors* 2014, Vol. 14, Pages 7451–7488 2014, 14, 7451–7488, doi:10.3390/S140407451.
54. Zhu, D.; Li, M.; Wang, Y.; Ge, L.; Qu, J.; Shen, M.; Jiang, H.; Wang, J.; Wang, M.R. Broadband Superluminescent Diode-Based Ultrahigh Resolution Optical Coherence Tomography for Ophthalmic Imaging. 2011, 16, 126006, doi:10.1117/1.3660314.
55. Wölfel, R.; Corman, V.M.; Guggemos, W.; Seilmaier, M.; Zange, S.; Müller, M.A.; Niemeyer, D.; Jones, T.C.; Vollmar, P.; Rothe, C.; et al. Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019. *Nature* 2020 581:7809 2020, 581, 465–469, doi:10.1038/s41586-020-2196-x.
56. Stephenson, S.; Eid, W.; Wong, C.H.; Mercier, E.; D'Aoust, P.M.; Kabir, M.P.; Baral, S.; Gilbride, K.A.; Oswald, C.; Straus, S.E.; et al. Urban Wastewater Contains a Functional Human Antibody Repertoire of Mucosal Origin. *Water Res* 2024, 267, 122532, doi:10.1016/J.WATRES.2024.122532.

57. Guliciuc, M.; Maier, A.C.; Maier, I.M.; Kraft, A.; Cucuruzac, R.R.; Marinescu, M.; Șerban, C.; Rebegea, L.; Constantin, G.B.; Fireescu, D. The Urosepsis – a Literature Review. *Medicina (Lithuania)* 2021, 57, doi:10.3390/MEDICINA57090872,.
58. Wagenlehner, F.M.; Lichtenstern, C.; Rolfes, C.; Mayer, K.; Uhle, F.; Weidner, W.; Weigand, M.A. Diagnosis and Management for Urosepsis. *International Journal of Urology* 2013, 20, 963–970, doi:10.1111/IJU.12200.
59. Jee, W.; Jo, S.; Lee, J.B.; Jin, Y.; Jeong, T.; Yoon, J.C.; Park, B. Mortality Difference between Early-Identified Sepsis and Late-Identified Sepsis. *Clin Exp Emerg Med* 2020, 7, 150, doi:10.15441/CEEM.19.009.
60. Dreger, N.M.; Degener, S.; Ahmad-Nejad, P.; Wöbker, G.; Roth, S. Urosepsis - Ursache, Diagnose Und Therapie. *Dtsch Arztebl Int* 2015, 112, 837–847, doi:10.3238/ARZTEBL.2015.0837,.
61. Hitzeman, N.; Greer, D.; Carpio, E. Office-Based Urinalysis: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* 2022, 106, 27-35B.
62. Thornton, H. V.; Hammond, A.; Hay, A.D. Urosepsis: A Growing and Preventable Problem? *The British Journal of General Practice* 2018, 68, 493, doi:10.3399/BJGP18X699317.
63. Brown, J.Q.; Vishwanath, K.; Palmer, G.M.; Ramanujam, N. Advances in Quantitative UV–Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-Clinical Application in Cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20, 119–131, doi:10.1016/J.COPBIO.2009.02.004.
64. Barroso, T.G.; Ribeiro, L.; Gregório, H.; Monteiro-Silva, F.; Neves dos Santos, F.; Martins, R.C. Point-of-Care Using Vis-NIR Spectroscopy for White Blood Cell Count Analysis †. *Chemosensors* 2022, 10, doi:10.3390/CHEMOSENSORS10110460/S1.
65. Radzevičius, A.; Dapkienė, M.; Sabienė, N.; Dzięcioł, J.; Radzevičius, A.; Dapkienė, M.; Sabienė, N.; Dzięcioł, J. A Rapid UV/Vis Spectrophotometric Method for the Water Quality Monitoring at On-Farm Root Vegetable Pack Houses. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, 2020, 10, 1–15, doi:10.3390/APP10249072.
66. Dias, K.E.; Sourris, K.C.; Jha, J.C.; Jandeleit-Dahm, K.; Wood, B.R.; Dias, K.E.; Sourris, K.C.; Jha, J.C.; Jandeleit-Dahm, K.; Wood, B.R. Rapid, Precise, and Clinically Relevant Quantification of Urinary Albumin and Creatinine Using a NanoDrop UV/Vis Spectrophotometer. *Sensors* 2025, Vol. 25, 2025, 25, doi:10.3390/S25113307.
67. Brunkhorst, F.M.; Wegscheider, K.; Forycki, Z.F.; Brunkhorst, R. Procalcitonin for Early Diagnosis and Differentiation of SIRS, Sepsis, Severe Sepsis, and Septic Shock. *Intensive Care Med* 2000, 26 Suppl 2, S148–S152, doi:10.1007/BF02900728.
68. Cho, S.Y.; Choi, J.H. Biomarkers of Sepsis. *Infect Chemother* 2014, 46, 1–12, doi:10.3947/IC.2014.46.1.1.
69. Luo, X.; Yang, X.; Li, J.; Zou, G.; Lin, Y.; Qing, G.; Yang, R.; Yao, W.; Ye, X. The Procalcitonin/Albumin Ratio as an Early Diagnostic Predictor in Discriminating Urosepsis from Patients with Febrile Urinary Tract Infection. *Medicine (United States)* 2018, 97, doi:10.1097/MD.00000000000011078,.
70. Feng, M.; Sun, T.; Zhao, Y.; Zhang, H. Detection of Serum Interleukin-6/10/18 Levels in Sepsis and Its Clinical Significance. *J Clin Lab Anal* 2016, 30, 1037, doi:10.1002/JCLA.21977.
71. Human IL-6 ELISA Kit - Quantikine D6050B: R&D Systems Available online: https://www.rndsystems.com/products/human-il-6-quantikine-elisa-kit_d6050b (accessed on 27 May 2025).

72. Cheruvanky, A.; Kirn, T.J.; Weinstein, M.P. Cost-Effectiveness of 30- Compared to 20-Milliliter Blood Cultures: A Retrospective Study. *J Clin Microbiol* 2015, **54**, 64, doi:10.1128/JCM.02024-15.
73. Mazlan, M.Z.; Wan Azman, W.N.; Yaacob, N.M.; Koon, T.S.; Yahya, N.K. Analytical Evaluation of Point-of-Care Finecare™ Procalcitonin Rapid Quantitative Test in Sepsis Population as Compared with Elecsys® BRAHMS Procalcitonin Immunoassay. *Diagnostics* 2024, **14**, doi:10.3390/DIAGNOSTICS14111080.
74. Shih, C.M.; Chang, C.L.; Hsu, M.Y.; Lin, J.Y.; Kuan, C.M.; Wang, H.K.; Huang, C. Te; Chung, M.C.; Huang, K.C.; Hsu, C.E.; et al. Paper-Based ELISA to Rapidly Detect Escherichia Coli. *Talanta* 2015, **145**, 2–5, doi:10.1016/J.TALANTA.2015.07.051.
75. Huang, D.; Ying, H.; Jiang, D.; Liu, F.; Tian, Y.; Du, C.; Zhang, L.; Pu, X. Rapid and Sensitive Detection of Interleukin-6 in Serum via Time-Resolved Lateral Flow Immunoassay. *Anal Biochem* 2020, **588**, 113468, doi:10.1016/J.AB.2019.113468.
76. Bermudez, T.; Schmitz, J.E.; Boswell, M.; Humphries, R. Novel Technologies for the Diagnosis of Urinary Tract Infections. *J Clin Microbiol* 2025, **63**, doi:10.1128/JCM.00306-24.
77. Dyrektywa - UE - 2024/3019 - EN - EUR-Lex Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX:32024L3019> (accessed on 3 July 2025).
78. Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B. Future Perspectives of Wastewater-Based Epidemiology: Monitoring Infectious Disease Spread and Resistance to the Community Level. *Environ Int* 2020, **139**, 105689, doi:10.1016/J.ENVINT.2020.105689.
79. Melendez-Pastor, I.; Almendro-Candel, M.B.; Navarro-Pedreño, J.; Gómez, I.; Lillo, M.G.; Hernández, E.I. Monitoring Urban Wastewaters' Characteristics by Visible and Short Wave Near-Infrared Spectroscopy. *Water* 2013, Vol. 5, Pages 2026-2036 2013, **5**, 2026–2036, doi:10.3390/W5042026.
80. Li, F.; Wang, X.; Yang, M.; Zhu, M.; Chen, W.; Li, Q.; Sun, D.; Bi, X.; Maletskyi, Z.; Ratnaweera, H. Detection Limits of Antibiotics in Wastewater by Real-Time UV–VIS Spectrometry at Different Optical Path Length. *Processes* 2022, Vol. 10, Page 2614 2022, **10**, 2614, doi:10.3390/PR10122614.
81. Pepys, M.B.; Hirschfield, G.M. C-Reactive Protein: A Critical Update. *J Clin Invest* 2003, **111**, 1805–1812, doi:10.1172/JCI18921.
82. Driver, E.M.; Gushgari, A.J.; Steele, J.C.; Bowes, D.A.; Halden, R.U. Assessing Population-Level Stress through Glucocorticoid Hormone Monitoring in Wastewater. *Science of The Total Environment* 2022, **838**, 155961, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.155961.
83. Nehring, S.M.; Goyal, A.; Bansal, P.; Patel, B.C. C-Reactive Protein: Clinical Relevance and Interpretation. *StatPearls* 2025, **65**, 237–244.
84. Jagadeesan, K.K.; Elliss, H.; Standerwick, R.; Robertson, M.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. Wastewater-Based Proteomics: A Proof-of-Concept for Advancing Early Warning System for Infectious Diseases and Immune Response Monitoring. *Journal of Hazardous Materials Letters* 2024, **5**, 100108, doi:10.1016/J.HAZL.2024.100108.
85. Freed, M.; Badal, A.; Jennings, R.J.; Heras, H.D. Las; Myers, K.J.; Badano, A. X-Ray Properties of an Anthropomorphic Breast Phantom for MRI and x-Ray Imaging. *Phys Med Biol* 2011, **56**, 3513, doi:10.1088/0031-9155/56/12/005.
86. Divkovic, G.W.; Liebler, M.; Braun, K.; Dreyer, T.; Huber, P.E.; Jenne, J.W. Thermal Properties and Changes of Acoustic Parameters in an Egg White Phantom During Heating and Coagulation

- by High Intensity Focused Ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2007, 33, 981–986, doi:10.1016/J.ULTRASMEDBIO.2006.11.021.
87. Bachir, W.; khir, R. Characterization of Pasteurized Milk in the near Infrared Range for Construction of Tissue-Mimicking Optical Phantoms. *Optical Materials: X* 2022, 14, 100154, doi:10.1016/J.OMX.2022.100154.
 88. Divkovic, G.W.; Liebler, M.; Braun, K.; Dreyer, T.; Huber, P.E.; Jenne, J.W. Thermal Properties and Changes of Acoustic Parameters in an Egg White Phantom During Heating and Coagulation by High Intensity Focused Ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2007, 33, 981–986, doi:10.1016/J.ULTRASMEDBIO.2006.11.021.
 89. Gao, J.; You, J.; Cochran, S.; Corner, G.; Huang, Z. Simultaneous Measurements of Thermo-Physical Properties of Egg White Phantoms for HIFU by Using the Step-Wise Transient Plane Source Technique. *AIP Conf Proc* 2012, 1481, 88–93, doi:10.1063/1.4757316.
 90. Wu, J. Tofu as a Tissue-Mimicking Material. *Ultrasound Med Biol* 2001, 27, 1297–1300, doi:10.1016/S0301-5629(01)00424-0.
 91. Fischmann, A.; Siegmann, K.C. Low-Cost Phantoms for Training of Stereotactic Vacuum-Assisted Biopsy of the Breast. *Clin Imaging* 2010, 34, 97–99, doi:10.1016/j.clinimag.2009.03.011.
 92. Jones, C.; MacKay, A.; Rutt, B. Bi-Exponential T2 Decay in Dairy Cream Phantoms. *Magn Reson Imaging* 1998, 16, 83–85, doi:10.1016/S0730-725X(97)00250-6.
 93. Zhernovaya, O.; Sydoruk, O.; Tuchin, V.; Douplik, A. The Refractive Index of Human Hemoglobin in the Visible Range. *Phys Med Biol* 2011, 56, 4013, doi:10.1088/0031-9155/56/13/017.
 94. Wang, Z.; Popescu, G.; Tangella, K. V.; Balla, A. Tissue Refractive Index as Marker of Disease. *J Biomed Opt* 2011, 16, 116017, doi:10.1117/1.3656732.
 95. Cho, Y.J.; Kim, T.E.; Gil, B. Correlation between Refractive Index of Vegetable Oils Measured with Surface Plasmon Resonance and Acid Values Determined with the AOCS Official Method. *LWT - Food Science and Technology* 2013, 53, 517–521, doi:10.1016/J.LWT.2013.03.016.
 96. Mutanen, J.; Rätty, J.; Gornov, E.; Lehtonen, P.; Peiponen, K.E.; Jaaskelainen, T. Measurement of Color, Refractive Index, and Turbidity of Red Wines. *Am J Enol Vitic* 2007, 58, 387–392, doi:10.5344/AJEV.2007.58.3.387.
 97. Shin, H.J.; Choi, S.W.; Ok, G. Qualitative Identification of Food Materials by Complex Refractive Index Mapping in the Terahertz Range. *Food Chem* 2018, 245, 282–288, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.10.056.
 98. Pradhan, P.; Rogers, J.D.; Subramanian, H.; Capoglu, I.R.; Brand, R.E.; Liu, Y.; Backman, V.; Roy, H.K. Partial-Wave Microscopic Spectroscopy Detects Subwavelength Refractive Index Fluctuations: An Application to Cancer Diagnosis. *Optics Letters, Vol. 34, Issue 4, pp. 518-520* 2009, 34, 518–520, doi:10.1364/OL.34.000518.
 99. Garcia-Cordero, J.L.; Piazza, V.; Bruce, N.C.; Rosete-Aguilar, M.; Garnica, G.; Gonzalez-Suarez, A.M.; Calixto, S. Liquid Refractive Index Measured through a Refractometer Based on Diffraction Gratings. *Optics Express, Vol. 27, Issue 24, pp. 34705-34720* 2019, 27, 34705–34720, doi:10.1364/OE.27.034705.
 100. Suhag, R.; Dhiman, A.; Thakur, D.; Kumar, A.; Upadhyay, A. Physico-Chemical and Functional Properties of Microfluidized Egg Yolk. *J Food Eng* 2021, 294, 110416, doi:10.1016/J.JFOODENG.2020.110416.

101. Jääskeläinen, A.J.; Peiponen, K.E.; Rätty, J.A. On Reflectometric Measurement of a Refractive Index of Milk. *J Dairy Sci* 2001, **84**, 38–43, doi:10.3168/JDS.S0022-0302(01)74449-9.
102. Dhakal, S.; Giusti, M.M.; Balasubramaniam, V.M. Effect of High Pressure Processing on Dispersive and Aggregative Properties of Almond Milk. *J Sci Food Agric* 2016, **96**, 3821–3830, doi:10.1002/JSFA.7576.
103. Szczerska, M.; Wityk, P.; Listewnik, P. Impact of Temperature on Optical Sensing in Biology Based on Investigation of SARS-CoV-2. *J Biophotonics* 2022, **16**, e202200186, doi:10.1002/JBIO.202200186.
104. Tang, H.; Liu, X.; Chen, S.; Yu, X.; Luo, Y.; Wu, J.; Wang, X.; Liu, L. Estimation of Refractive Index for Biological Tissue Using Micro-Optical Coherence Tomography. *IEEE Trans Biomed Eng* 2019, **66**, 1803–1809, doi:10.1109/TBME.2018.2885844.
105. Elsherif, M.; Salih, A.E.; Muñoz, M.G.; Alam, F.; AlQattan, B.; Antonysamy, D.S.; Zaki, M.F.; Yetisen, A.K.; Park, S.; Wilkinson, T.D.; et al. Optical Fiber Sensors: Working Principle, Applications, and Limitations. *Adv Photonics Res* 2022, **3**, 2100371, doi:10.1002/ADPR.202100371.
106. Rheims, J.; Köser, J.; Wriedt, T. Refractive-Index Measurements in the near-IR Using an Abbe Refractometer. *Meas Sci Technol* 1997, **8**, 601, doi:10.1088/0957-0233/8/6/003.
107. Sokolov, V.I.; Savelyev, A.G.; Bouznik, V.M.; Igumnov, S.M.; Khaydukov, E. V.; Molchanova, S.I.; Tuytuynov, A.A.; Akhmanov, A.S.; Panchenko, V.Y. Refractive Index and Dispersion of Highly Fluorinated Acrylic Monomers in the 1.5 Mm Telecom Wavelength Region Measured with a Spectroscopic Abbe Refractometer. *Meas Sci Technol* 2014, **25**, 077001, doi:10.1088/0957-0233/25/7/077001.
108. Vijayavenkataraman, S.; Lu, W.F.; Fuh, J.Y.H.; Ismayilzada, N.; Tarar, C.; Dabbagh, S.R.; Ding, H.; Lu, J.Q.; Wooden, W.A.; Kragel, P.J.; et al. Refractive Indices of Human Skin Tissues at Eight Wavelengths and Estimated Dispersion Relations between 300 and 1600 Nm. *Phys Med Biol* 2006, **51**, 1479, doi:10.1088/0031-9155/51/6/008.
109. Gu, H.; Zhu, S.; Song, B.; Fang, M.; Guo, Z.; Chen, X.; Zhang, C.; Jiang, H.; Liu, S. An Analytical Method to Determine the Complex Refractive Index of an Ultra-Thin Film by Ellipsometry. *Appl Surf Sci* 2020, **507**, 145091, doi:10.1016/J.APSUSC.2019.145091.
110. Haider, M.S.U.K.; Chen, C.; Ghaffar, A.; Noor, L.U.; Liu, M.; Hussain, S.; Arman, B.; Alathbah, M. Smartphone-Based Optical Fiber Sensor for Refractive Index Sensing Using POF. *Sens Actuators A Phys* 2025, **385**, 116321, doi:10.1016/J.SNA.2025.116321.
111. Fernandez-Vallejo, M.; Lopez-Amo, M. Optical Fiber Networks for Remote Fiber Optic Sensors. *Sensors* 2012, Vol. 12, Pages 3929–3951 2012, **12**, 3929–3951, doi:10.3390/S120403929.
112. Yoshino, T.; Ose, T.; Kurosawa, K.; Itoh, K. Fiber-Optic Fabry–Perot Interferometer and Its Sensor Applications. *IEEE Trans Microw Theory Tech* 1982, **30**, 1612–1621, doi:10.1109/TMTT.1982.1131298.
113. Dominguez-Flores, C.E.; Monzon-Hernandez, D.; Moreno-Basulto, J.I.; Rodriguez-Quiroz, O.; Minkovich, V.P.; Lopez-Cortes, D.; Hernandez-Romano, I. Real-Time Temperature Sensor Based on In-Fiber Fabry-Perot Interferometer Embedded in a Resin. *Journal of Lightwave Technology* 2019, **37**, 1084–1090, doi:10.1109/JLT.2018.2886134.
114. Vaughan, J.M. The Fabry-Perot Interferometer: History, Theory, Practice and Applications. *The Fabry-Perot Interferometer: History, Theory, Practice and Applications* 2017, 1–583, doi:10.1201/9780203736715.

115. Deng, Z.; Wang, J.; Ye, Q.; Sun, T.; Zhou, W.; Mei, J.; Zhang, C.; Tian, J. Determination of Continuous Complex Refractive Index Dispersion of Biotissue Based on Internal Reflection. *J Biomed Opt* 2016, *21*, 015003, doi:10.1117/1.JBO.21.1.015003.
116. Shanshool, A.; Lazareva, E.N.; Tuchin, V. V. Measurement of the Refractive Index of the Gray Matter of the Cow's Brain at Wavelengths of 480-1550 Nm When Exposed to Different Temperatures. *Proceedings Volume 12192, Optical Technologies for Biology and Medicine* 2022, *12192*, 221–235, doi:10.1117/12.2634156.
117. SIMERVILLE, J.A.; MAXTED, W.C.; PAHIRA, J.J. Urinalysis: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* 2005, *71*, 1153–1162.
118. Sueksakit, K.; Thongboonkerd, V. Optimization of Artificial Urine Formula for in Vitro Cellular Study Compared with Native Urine. *Int J Med Sci* 2021, *18*, 3271, doi:10.7150/IJMS.61720.
119. McLean, R.J.C.; Nickel, J.C.; Noakes, V.C.; Costerton, J.W. An in Vitro Ultrastructural Study of Infectious Kidney Stone Genesis. *Infect Immun* 1985, *49*, 805–811, doi:10.1128/IAI.49.3.805-811.1985.
120. Franke, L.; Fuczik, C.; Hubig, M.; Peters, F.T.; Wissenbach, D.K. Evaluation of Biochemical Assays and Optimization of LC-MS-MS Analysis for the Detection of Synthetic Urine. *J Anal Toxicol* 2024, *48*, 37–43, doi:10.1093/JAT/BKAD082,.
121. Di Natale, C.; La Manna, S.; Carbone, S.; Coppola, S.; Vespini, V.; Tkachenko, V.; Tammaro, D.; Russo, S.; Vitiello, G.; Luciani, G.; et al. Highly Sensitive Detection of Different Aggregation Stages of A β 1-42 -Amyloid Peptide in Urine-like Samples by Auto-Fluorescence. *Anal Chim Acta* 2025, *1374*, 344531, doi:10.1016/J.ACA.2025.344531.
122. Brooks, T.; Keevil, C.W. A Simple Artificial Urine for the Growth of Urinary Pathogens. *Lett Appl Microbiol* 1997, *24*, 203–206, doi:10.1046/J.1472-765X.1997.00378.X.
123. Wilks, S.A.; Morris, N.S.; Thompson, R.; Prieto, J.A.; Macaulay, M.; Moore, K.N.; Keevil, C.W.; Fader, M. An Effective Evidence-Based Cleaning Method for the Safe Reuse of Intermittent Urinary Catheters: In Vitro Testing. *Neurourol Urodyn* 2020, *39*, 907–915, doi:10.1002/NAU.24296;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15206777;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
124. Chutipongtanate, S.; Thongboonkerd, V. Systematic Comparisons of Artificial Urine Formulas for in Vitro Cellular Study. *Anal Biochem* 2010, *402*, 110–112, doi:10.1016/J.AB.2010.03.031.
125. Sarigul, N.; Korkmaz, F.; Kurultak, İ. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. *Sci Rep* 2019, *9*, 1–11, doi:10.1038/S41598-019-56693-4
126. Buy Artificial Urine, Synthetic Urine, Simulated Urine (BZ186) at Low Price Available online: <https://biochemazone.com/product/artificial-urine-simulated-urine-bz186/> (accessed on 17 December 2025).
127. Artificial Urine EN ISO 20696:2018 (BZ346) Low Price Available online: https://biochemazone.com/product/en-iso-206962018-artificial-urine-bz346/?srsltid=AfmBOopljqUKuJkZE0vcrZY9_mTmS43XEWrtq6Nv43wkg_RlrfTp551l (accessed on 17 December 2025).
128. Artificial Urine for Hydration Urine Color Simulation Available online: <https://biochemazone.com/product/artificial-urine-for-hydration-urine-color-simulation-bz510/> (accessed on 17 December 2025).

129. Surine E Control - Synthetic Life Sciences Available online: <https://cleansynthetics.com/shop/synthetic-urine/surine-e-control/> (accessed on 17 December 2025).

LETTER OPEN ACCESS

Optical Method for the Detection of Viral RNA Using an Optical Fiber Sensor

Patryk Sokołowski¹  | Paweł Wityk^{2,3}  | Joanna Raczak-Gutknecht² | Wiktoria Brzezińska² | Michał Sobaszek¹ | Paweł Kalinowski⁴ | Sebastian Garcia-Galan⁵ | Małgorzata Szczerska¹ 

¹Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland | ²Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland | ³Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland | ⁴Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland | ⁵Telecommunications Engineering Department, Linares Higher Polytechnic School, Jaén University, 23700 Linares, Jaén, Spain

Correspondence: Paweł Wityk (pawel.wityk@gumed.edu.pl)

Received: 10 February 2025 | **Revised:** 11 April 2025 | **Accepted:** 7 May 2025

Funding: This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education [NdS—II/SP/0438/2024/01], DS program of Telecommunications and Informatics of Gdańsk University of Technology, TECHNETIUM Talent Management [14/1/2024/IDUB/III.4.1/Tc], COST Action [CA21159].

Keywords: fiber-optic sensor | optical detection | viral detection

ABSTRACT

This study introduces a fiber-optic sensor functionalized with a sensing probe for SARS-CoV-2 RNA detection. The sensor employs a microsphere design at the sensor's tip, enhanced with a gold layer and oligonucleotide probes, to achieve high sensitivity and specificity. Utilizing optical interference, the system enables near real-time monitoring of viral RNA at concentrations as low as 10^{-12} M. While the sensor's sensitivity is lower than that of the RT-PCR, it excels in speed, portability, and scalability, making it suitable for point-of-care diagnostics, environmental monitoring, and large-scale screening. The integration of fiber-optic sensors with advanced analytical systems further enhances their utility in preventing virus transmission and contamination, highlighting their role in global efforts to combat infectious diseases.

1 | Introduction

In viral diagnostics, a critical challenge lies in the rapid and accurate detection of pathogens or viral particles, enabling timely responses to health threats. Fiber-optic sensors provide near real-time measurement capabilities [1], which are crucial for epidemic control and prevention of disease outbreaks. The ability to deliver quick and reliable results ensures that public health interventions can be implemented without delay, ultimately reducing the spread of infectious diseases. Another significant advantage of these sensors is their biocompatibility. Fiber-optic probes can be directly positioned in biological samples without disrupting the native environment, preserving sample integrity and improving the accuracy of detection [2].

Biosensor based on fiber optics, particularly in medical diagnostics for the detection of viruses, utilizes light modulation within the fiber to monitor interactions with biological samples. Recent studies highlight the development of cost-effective optical fiber biosensors that cover different geometries, vary in biofunctionalization, and allow for real-time monitoring and miniaturization for point-of-care testing [3]. Fiber-optic-based biosensors have a broad range of applications including CRP detection [4], vaccinia virus [5], *Escherichia coli* bacteria [6], cancer cells [7], antibody detection [8] and numerous other applications [9]. Despite many advantages, challenges such as improving sensitivity remain. However, ongoing developments in materials and analytical techniques promise to enhance the performance and applicability of fiber-optic sensors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2025 The Author(s). *Journal of Biophotonics* published by Wiley-VCH GmbH.

Beyond medical applications, fiber-optic sensors have demonstrated utility in environmental monitoring and industrial quality control [10]. In wastewater analysis, they can identify viral or bacterial contaminants, providing valuable insights into the epidemiological trends of communities and aiding in the early detection of potential outbreaks. Similarly, in the food industry, the rapid detection of pathogens enhances food safety and prevents the distribution of contaminated products [11]. The versatility of fiber-optic technology extends to its ability to integrate with advanced analytical systems and automated monitoring platforms. This integration not only improves detection sensitivity and throughput but also enables remote monitoring, leading to innovative solutions to prevent virus transmission and contamination [12].

Our fiber-optic biosensor for the detection of viral RNA represents an approach that combines advanced optical technologies with biofunctionalization. The sensor utilizes telecommunication-grade optical fiber, which has been chemically modified to create a biofunctionalized layer capable of specifically binding viral RNA. This design allows for a significant reduction in sample volume, enhancing measurement stability and reducing the analysis time to just a few minutes. While the RT-PCR test remains the gold standard for virus detection due to its high accuracy and specificity, its reliance on skilled personnel and specialized laboratory equipment poses limitations in resource-constrained settings [13]. In contrast, fiber-optic sensors offer a promising alternative, particularly for large-scale screening programs. Their potential for rapid, automated, and cost-effective operation makes them an attractive option for mass testing during public health emergencies. As sensor technology and biomolecular recognition continue to advance, fiber-optic sensors are poised to play a key role in global efforts to combat infectious diseases.

2 | Material and Method

2.1 | Sensing Probe Functionalization

An optical fiber was modified through a series of precise functionalization steps to enhance its capability for specific RNA detection. Initially, a microsphere was formed at the tip of the

telecommunications optical fiber (SMF-28, Thorlabs, USA). The fiber has a diameter of 125 μm . The tip of the fiber was modified (Figure 1a) using a fiber-optic splicer (FSU975, Ericsson, Sweden). This step resulted in obtaining a sphere of 282 μm diameter, which in subsequent steps the active layer of the sensor was applied in the next steps. This probe design ensures minimizing the influence of temperature fluctuations and vibrations, an increase in the active area of the resulting probe, and enables real-time structural integrity monitoring [14]. It is due to a fixed resonance cavity inside the sensor that allows monitoring its condition during measurements. Any changes in the probe surface or damage to the probe will be immediately seen in the measured signal.

In the subsequent step, a thin gold layer (100 nm) was deposited onto the surface of the microsphere using the Physical Vapor Deposition (PVD) technique (PVD75, Kurt J. Lesker, USA), employing thermal evaporation. High-purity gold pellets (99.999%) were placed on a molybdenum evaporation boat to facilitate the evaporation process. The base pressure within the chamber was maintained below 10^{-6} Torr, and the deposition rate was set to 5 $\text{\AA}/\text{s}$. All process parameters, including the power (which determined the temperature of the evaporation boat), were precisely controlled via the KJLC eKlipse software. Material-specific parameters for gold, such as atomic weight (196.966569 u), coefficient of thermal expansion ($14.2 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$), and density ($19.32 \text{ g}/\text{cm}^3$), were accounted for during the deposition. The thickness of the deposited gold film was monitored and controlled using two independent quartz crystal microbalance sensors equipped with gold-coated crystals. Gold was selected as the material for coating the microsphere due to its high stability and ease of biofunctionalization [15]. A thickness of 100 nm was intentionally selected to permit a fraction of the optical signal to penetrate the gold layer and reach the biochemical layer. As a following step, the fiber with gold surface was cleaned using a solution of H_2SO_4 (50 mM) and H_2O_2 (10 mM) in ultrapure water and subsequently rinsed thoroughly with ultrapure water. A previously incubated oligonucleotide probe (5'-HS-AAA AAA AAA TGA TGA ACA GTT TAG GTG AAA CTG ATC T-3' [16]) with TCEP-agarose was then used to modify the gold surface with a DNA probe. After 12 h, excess unbound DNA was removed by rinsing with deionized water. The fiber-optic tip was then incubated overnight

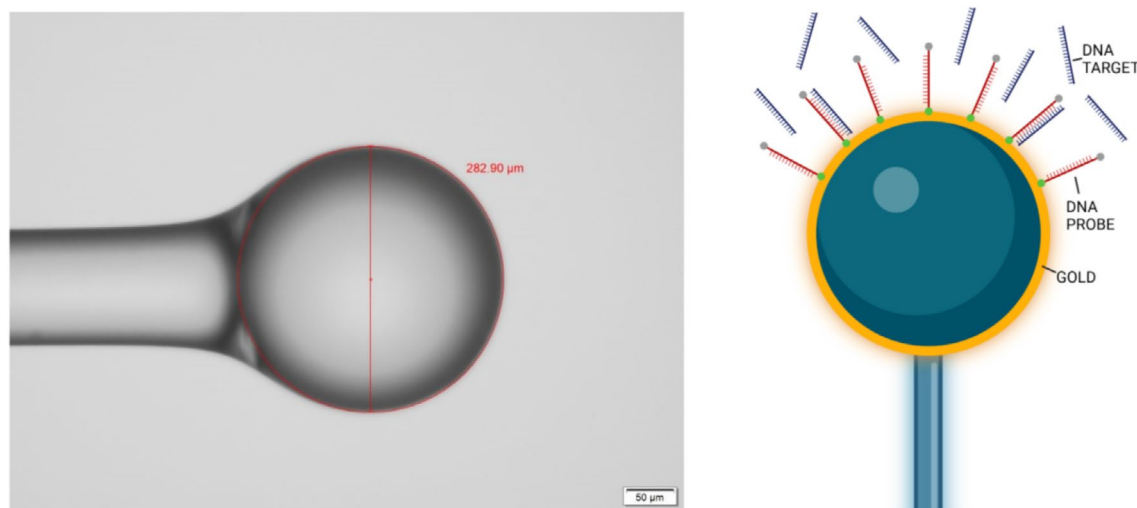


FIGURE 1 | (a) Microsphere created at the fiber tip under microscope (b) scheme of sensor's probe.

in a 5 μ M MCU (11-mercaptododecanol) solution at 30°C to allow the DNA probe to attain flexible movement (if not treated, the probe would remain immobilized on the gold surface, limiting its interaction efficiency with target molecules) (Figure 1b). After incubation, the fiber-optic tip was rinsed with PBS and stored in 1 $\times$ PBS at 4°C until measurements were performed.

2.2 | Measurement Setup

The biophotonic measurement system consisted of a broad-band light source, which is a superluminescent laser diode with

a central wavelength of 1330 nm (SLD-1310-18-W, Fiberlabs, USA), a 2 $\times$ 1 fiber-optic coupler (Thorlabs, USA), and a spectrum analyzer (Ando AQ6319, Yokogawa, Japan) as a detector. A sensor head with a biofunctionalized microsphere was spliced into one of the coupler arms. The sensor's cost, size, and maintenance requirements are reduced due to the absence of external mirrors and stabilizing micromechanical components. Additionally, it simplifies probe placement in the measurement environment and enhances reliability and operational safety.

In Figure 2, the recorded spectra after the application of successive layers building the sensor are presented. The sensor uses

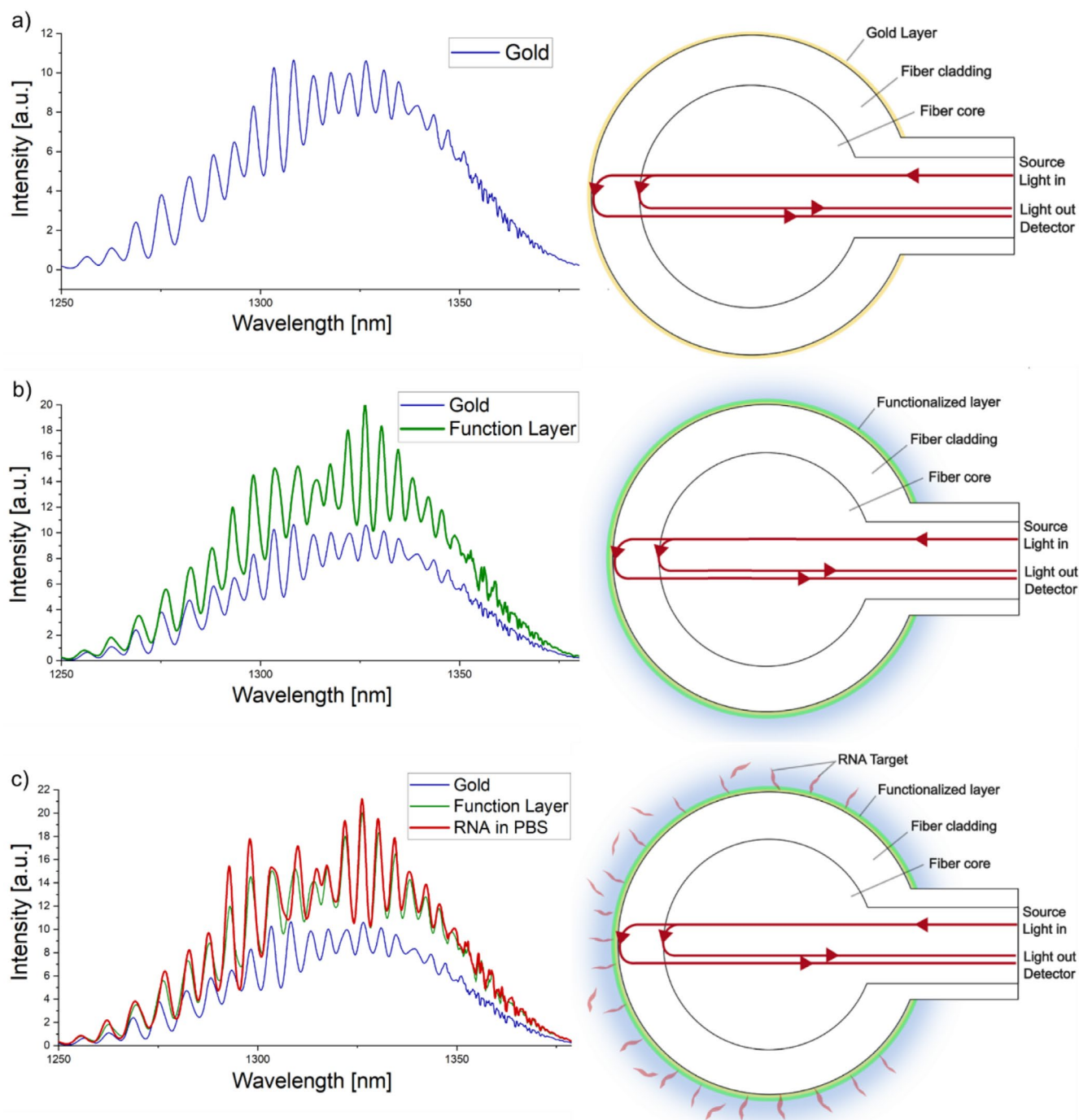


FIGURE 2 | Principle of operation of the microsphere-based fiber-optic sensor, (a) obtained spectra—microsphere with gold layer, (b) obtained spectra—microsphere with biofunctionalized layer, (c) obtained spectra—functionalized probe immersed in the solution of RNA in PBS.

the phenomenon of interference to operate. A coherent light was coupled into an optical fiber. As shown in Figure 2b, in an optical fiber, there is a core and a cladding with different refractive indices. At the boundary between these media, the light beam splits into two parts. One part is reflected back toward the sensor, while the other is transmitted further to the investigated medium. A cladding and layer of the investigated medium create the second boundary. The transmitted beam reflects off this boundary. As a result, the two reflected beams combine in superposition, creating interference. The phase difference introduced into those beams influences the measurement spectra. The reflection obtained on the core-cladding boundary is always constant, while the reflection on the surface of the microsphere is highly dependent on the properties of the examined medium or layer that covers the fiber tip.

In the presented sensor, changes in the optical properties occur within the sensing layer. Surface functionalization with specific recognition elements ensures that the observed optical responses result from targeted biochemical interactions. The attachment of molecules to the sensing layer leads to a modification in the refractive index, resulting in phase shifts, as well as changes in absorption occurring in signal intensity change. These changes in refractive index and absorption appear in the recorded optical spectrum. While the dominant effect in the presented sensor is a change in absorption, leading to noticeable signal intensity changes, the refractive index change inducing phase shifts is less significant, but still visible in the spectral response.

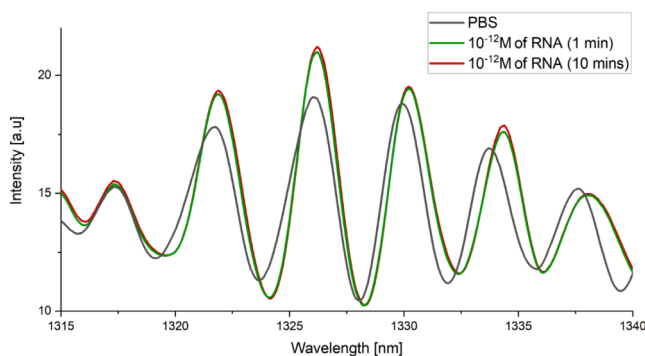


FIGURE 3 | Recorded spectra—sample with Viral RNA in PBS.

3 | Measurements and Results

This multilayer structure of gold, DNA, and MCU creates an optically responsive surface, allowing for the real-time detection of viral RNA through changes in optical properties visible in obtained spectra. The DNA probe is complementary to SARS-COV-2 viral RNA. A noticeable change in the recorded signal intensity is observed, with the intensity increasing progressively with each additional layer forming the sensor head. This can be attributed to the rising reflectance caused by the accumulation of molecules attached to the surface of the microsphere.

The RNA measurements of viral genetic material (synthetic SARS-CoV-2 RNA) (ATCC-VR-3276SD, LGC Standards, Warsaw, Poland) in phosphate-buffered saline (1×PBS) were conducted, using solutions prepared at a concentration of 10^{-12} M. This concentration contains the amount of RNA that can be found in a patient's swab. The measurement head was placed within the prepared liquid samples. The temperature of the samples was kept constant throughout the experiment at room temperature. The probe was immersed in the solution for 10 min, during which measurements were recorded every minute, resulting in a total of 10 measurements per sample. In the recorded spectrum (Figure 3), variations in the intensity of most peaks were observed and a noticeable spectral shift.

From the obtained data, it can be concluded that the sensor is functioning as expected. Measurements were successfully recorded in operational concentration of 10^{-12} M. The highest increase in intensity was observed at a wavelength of approximately 1326 nm. This increase amounted to 10.2% and 11.3% for measurements after 1 and 10 min of immersion in the RNA solution in PBS, compared to pure PBS. This time-dependent growth in signal intensity suggests a progressive binding of RNA to the sensing surface indicating effective interaction over time. Analysis of the spectrum reveals not only variations in signal intensity but also noticeable spectral changes. It can be made due to the change of the refractive index of the second reflected layer made on the boundary fiber-optic probe/measured sample. When the detecting surface is covered with the attached virials, the refractive index of this surface changes, hence the reflection coefficient changes as well. On the other hand, slight

TABLE 1 | Selected Sars-Cov2 RNA detection methods.

Method	Detection limit	Analysis time	Required amplification	References
Fiber-optic sensor	1 pM	Near real time (~1 min)	No	Presented
RT-PCR	0.81 copies/uL (~1 aM)	~few hours	Yes	[18]
Plasmonic photothermal biosensor	0.22 pM	Near real time	No	[19]
Electrochemical	0.1 pM	Near real time	No	[20]
Capacitive biosensor	10 nM	~1 h	No	[21]
CRISPR electrochemical biosensor	0.01 fM	3 h	No	[22]
Fluorescent biosensor based on isothermal amplification	0.1 aM	30–50 min	Yes	[23]

changes in the signal modulation can be attributed to the geometrical changes of the sensors made by the biological layer of the probe, which are made by attached virials. The observed optical changes provide clear evidence of specific interactions occurring at the sensor surface, which opens possibilities for quantitative analysis and potential application in real-time detection systems.

4 | Discussion

The proposed sensor allows achieving the lowest detectable concentration at the level of 1 pM, which can be recognized as a lower value compared to PCR methods, which are the gold standard for SARS-CoV-2 detection [17]. The development of fiber-optic sensors, especially in terms of increasing their sensing performance, is one of the main directions of development. However, sensitivity and limit of detection are not the only aspects. The described method is significantly faster and does not require RNA amplification, which simplifies the procedure and reduces the time and cost of analysis.

Table 1 shows selected methods and parameters for comparison of RNA detection of viruses. The proposed method can be compared to a biosensor for RNA detection utilizing plasmonic photothermal effects, which achieved a LOD of 0.22 pM for SARS-CoV-2 RNA detection without RNA amplification [19]. Another example that enables near real-time detection of RNA is the use of electrochemistry, where measurements were achieved with a detection limit of 26 fM [20]. The electrochemical approach can be combined with the CRISPR technique, allowing the sensor to detect concentrations as low as 0.01 fM within an analysis time of 3 h. Although these methods exhibit higher sensitivity, the presented approach offers unique advantages in terms of scalability, portability, and near real-time monitoring capabilities. Worth mentioning is the fiber optics aptasensor based on evanescent wave with a LOD of 740 fg/mL within 6 min read-out time [24]. Compared to the previously mentioned sensors, it is not based on RNA, but on virus particle detection. A possible approach to enhancing the sensitivity of the presented sensor could be the use of signal enhancement techniques compatible with optical platforms, such as employing nanoparticles to amplify the optical signal [25].

The primary strengths of our fiber sensor are measurement time, simplicity, the possibility of integration into a portable device, and the potential to be used in point-of-care diagnostics. Additionally, the use of an optical fiber sensor enables the construction of an entire network of sensors. This capability allows for monitoring over large areas, making it highly suitable for applications such as environmental sensing or large-scale diagnostic systems. With such an implementation, there may be challenges related to active layer degradation and the limitation of reuse. It is likely that the future development of bioactive layers will improve the viability of the sensor.

On the other hand, there is a risk of degradation of surface-immobilized DNA due to nucleases present in biological samples, as well as to environmental stressors such as elevated temperature and UV radiation. Therefore, evaluating the stability and

reproducibility of the sensor over multiple measurement cycles is necessary to ensure reliability in real samples.

Another significant challenge arises from the high mutation rates observed in viral genomes. As the sensor is designed to bind a specific nucleotide sequence, the genetic variation within the target region may alter the target sequence, leading to loss of detection capability. This limitation is analogous to the need for periodic adjustment of influenza vaccines and highlights the necessity of redesigning DNA probes to effectively detect newly emerging viral variants.

5 | Conclusion

Optical sensors based on DNA biofunctionalized fiber-optic microspheres have demonstrated great potential for detecting viral RNA or other genetic material. By applying appropriate surface modifications, such as the immobilization of specific nucleic acid probes, these microsphere-based sensors can achieve high sensitivity and selectivity in the detection of target sequences. The sensors' performance was validated through measurements of SARS-CoV-2 RNA at a concentration of 10^{-12} M.

The newly developed class of fiber-optic sensor presents a compelling advancement in sensing technology, offering important improvements over existing sensors of comparable size: shorter measurement time where a single measurement can be completed in just 1 min, reduced sample volume requirement to microliters of investigated liquid, pointwise measurement capability in comparison to some existing sensors that provide only bulk measurements, and elimination of pre-measurement sample preparation which simplifies the experimental workflow and reduces the risk of contamination or alteration of the sample. The sensor's design also minimizes the influence of external factors, such as temperature fluctuations, vibrations, and electromagnetic fields. Overall, the compact size of fiber sensors, the ability to integrate with optical systems, and the capacity for real-time monitoring make them a versatile tool in various applications, including biomedical diagnostics, environmental monitoring, and virology research.

Author Contributions

Patryk Sokołowski, Paweł Wityk, Małgorzata Szczerska: conceptualization, Patryk Sokołowski, Paweł Wityk, Joanna Raczak-Gutknecht, Wiktoria Brzezińska: investigation, Patryk Sokołowski, Paweł Wityk: writing – original draft, Sebastian Garcia-Galan, Małgorzata Szczerska, Paweł Kalinowski, Małgorzata Szczerska: writing – review and editing.

Acknowledgments

Thanks to Monika Kosowska for linguistically checking the paper. This research was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education under project NdS-II/SP/0438/2024/01 (P.W.) of Gdansk Medical University, by DS programs of the Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of Gdańsk University of Technology, by the 14/1/2024/IDUB/III.4.1/Tc (M.Sz.) grant under the TECHNETIUM Talent Management Grants and by COST Action CA21159 (M.Sz.).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Patryk Sokołowski
Paweł Wityk
Joanna Raczak-Gutknecht
Wiktoria Brzezińska
Michał Sobaszek
Paweł Kalinowski
Sebastian Garcia-Galan
Małgorzata Szczerska

References

1. A. Uniyal, G. Srivastava, A. Pal, S. Taya, and A. Muduli, "Recent Advances in Optical Biosensors for Sensing Applications: A Review," *Plasmonics* 18 (2023): 735–750, <https://doi.org/10.1007/S11468-023-01803-2> /METRICS.
2. T. Pan, D. Lu, H. Xin, and B. Li, "Biophotonic Probes for Bio-Detection and Imaging," *Light: Science & Applications* 10 (2021): 1–22, <https://doi.org/10.1038/s41377-021-00561-2>.
3. C. Leitão, S. O. Pereira, C. Marques, et al., "Cost-Effective Fiber Optic Solutions for Biosensing," *Biosensors* 12 (2022): 575, <https://doi.org/10.3390/BIOS12080575>.
4. K. Cierpiak, P. Wityk, M. Kosowska, et al., "C-Reactive Protein (CRP) Evaluation in Human Urine Using Optical Sensor Supported by Machine Learning," *Scientific Reports* 14 (2024): 18854, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67821-0>.
5. A. Rakhimbekova, B. Kudaibergenov, K. Seitkamal, et al., "Rapid Detection of Vaccinia Virus Using Biofunctionalized Fiber-Optic Ball-Tip Biosensors," *Scientific Reports* 13 (2023): 17470, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44926-6>.
6. L. Singh, G. Kumar, S. Jain, and B. Kumar Kaushik, "A Novel Plus Shaped Cavity Based Optical Fiber Sensor for the Detection of Escherichia-Coli," *Results in Optics* 5 (2021): 100156, <https://doi.org/10.1016/J.RIO.2021.100156>.
7. F. Jin, Z. Xu, D. Cao, Y. Ran, and B. O. Guan, "Fiber-Optic Biosensors for Cancer Theranostics: From In Vitro to In Vivo," *Photonic Sensors* 14 (2024): 1–32, <https://doi.org/10.1007/S13320-024-0706-4>.
8. M. Szczerska, P. Wityk, and P. Listewnik, "The SARS-CoV-2 Specific IgG Antibodies Biophotonic Sensor," *Journal of Biophotonics* 16 (2023): e202200172, <https://doi.org/10.1002/JBIO.202200172>.
9. M. A. Butt, G. S. Voronkov, E. P. Grakhova, R. V. Kutluyarov, N. L. Kazanskiy, and S. N. Khonina, "Environmental Monitoring: A Comprehensive Review on Optical Waveguide and Fiber-Based Sensors," *Biosensors* 12 (2022): 1038, <https://doi.org/10.3390/BIOS12111038>.
10. R. S. Mahendran, L. Wang, V. R. Machavaram, et al., "Fiber-Optic Sensor Design for Chemical Process and Environmental Monitoring," *Optics and Lasers in Engineering* 47 (2009): 1069–1076, <https://doi.org/10.1016/J.OPTLASENG.2009.05.013>.
11. A. K. Singh, S. Mittal, M. Das, A. Saharia, and M. Tiwari, "Optical Biosensors: a Decade in Review," *Alexandria Engineering Journal* 67 (2023): 673–691, <https://doi.org/10.1016/J.AEJ.2022.12.040>.
12. M. Xu, Y. Li, C. Lin, et al., "Recent Advances of Representative Optical Biosensors for Rapid and Sensitive Diagnostics of SARS-CoV-2," *Biosensors* 12 (2022): 862, <https://doi.org/10.3390/BIOS12100862>.
13. F. Watzinger, K. Ebner, and T. Lion, "Detection and Monitoring of Virus Infections by Real-Time PCR," *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2006): 254–298, <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.12.001>.
14. M. Hirsch, P. Listewnik, P. Struk, M. Weber, M. Bechelany, and M. Szczerska, "ZnO Coated Fiber Optic Microsphere Sensor for the Enhanced Refractive Index Sensing," *Sensors and Actuators, A: Physical* 298 (2019): 111594, <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2019.111594>.
15. V. Scognamiglio, A. Antonacci, M. T. Giardi, and R. E. Ionescu, "Updates on the Biofunctionalization of Gold Nanoparticles for the Rapid and Sensitive Multiplatform Diagnosis of SARS-CoV-2 Virus and Its Proteins: From Computational Models to Validation in Human Samples," *International Journal of Molecular Sciences* 24 (2023): 9249, <https://doi.org/10.3390/IJMS24119249>.
16. P. Wityk, A. Terebienieć, R. Nowak, et al., "Reusable Biosensor for Easy RNA Detection From Unfiltered Saliva," *Sensors* 25 (2025): 360, <https://doi.org/10.3390/S25020360/S1>.
17. R. Arnaout, R. A. Lee, G. R. Lee, et al., "The Limit of Detection Matters: The Case for Benchmarking Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Testing," *Clinical Infectious Diseases* 73 (2021): E3042–E3046, <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1382>.
18. H. Tombuloglu, H. Sabit, H. Al-Khallaif, et al., "Multiplex Real-Time RT-PCR Method for the Diagnosis of SARS-CoV-2 by Targeting Viral N, RdRP and Human RP Genes," *Scientific Reports* 12 (2022): 2853, <https://doi.org/10.1038/S41598-022-06977-Z>.
19. G. Qiu, Z. Gai, Y. Tao, J. Schmitt, G. A. Kullak-Ublick, and J. Wang, "Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection," *ACS Nano* 14 (2020): 5268–5277, <https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.0C02439>.
20. Y. Peng, Y. Pan, Z. Sun, et al., "An Electrochemical Biosensor for Sensitive Analysis of the SARS-CoV-2 RNA," *Biosensors & Bioelectronics* 186 (2021): 113309, <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113309>.
21. C. Hwang, N. Park, E. S. Kim, et al., "Ultra-Fast and Recyclable DNA Biosensor for Point-Of-Care Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19)," *Biosensors & Bioelectronics* 185 (2021): 113177, <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113177>.
22. L. Kashefi-Kheyrabadi, H. V. Nguyen, A. Go, and M. H. Lee, "Ultra-sensitive and Amplification-Free Detection of SARS-CoV-2 RNA Using an Electrochemical Biosensor Powered by CRISPR/Cas13a," *Bioelectrochemistry* 150 (2023): 108364, <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTCHEM.2023.108364>.
23. C. H. Woo, S. Jang, G. Shin, G. Y. Jung, and J. W. Lee, "Sensitive Fluorescence Detection of SARS-CoV-2 RNA in Clinical Samples via One-Pot Isothermal Ligation and Transcription," *Nature Biomedical Engineering* 4, no. 12 (2020): 1168–1179, <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00617-5>.
24. C. Xiao, N. Wang, Y. Zhao, et al., "Rapid and Sensitive Detection of Inactivated SARS-CoV-2 Virus via Fiber-Optic and Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Aptasensors," *Biosensors-Basel* 14 (2024): 231, <https://doi.org/10.3390/BIOS14050231/S1>.
25. X. Cao, Y. Ye, and S. Liu, "Gold Nanoparticle-Based Signal Amplification for Biosensing," *Analytical Biochemistry* 417 (2011): 1–16, <https://doi.org/10.1016/J.AB.2011.05.027>.



Remote real-time wastewater surveillance by the optical sensor supported by machine learning

Małgorzata Szczerska^{a,*}, Kacper Cierpiak^a, Monika Kosowska^b, Paweł Wityk^{c,d},
Sebastián García-Galán^e, Patryk Sokołowski^a, Sylwia Fudala-Książek^f, Michał T. Tomczak^g,
Bei Ye^h, Aneta Łuczkiwicz^f

^a Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza Street, 80-233 Gdańsk, Poland

^b Faculty of Telecommunications, Computer Science and Electrical Engineering, Bydgoszcz University of Science and Technology, Al. Prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland

^c Department of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza Street, 80-233 Gdańsk, Poland

^d Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, Pharmacy Faculty, Gdańsk, Poland

^e Telecommunications Engineering Department, Linares Higher Polytechnic School, Jaén University, Avenida de la Universidad S/N, 23700, Linares, Jaén, Spain

^f Department of Water and Wastewater Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza Street, 80-233 Gdańsk, Poland

^g Faculty of Management and Economics, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza Street, 80-233 Gdańsk, Poland

^h Shenzhen Key Laboratory of Ecological Remediation and Carbon Sequestration, Environmental Protection Key Laboratory of Microorganism Application and Risk Control, Institute of Environment and Ecology, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, 518055, PR China

ARTICLE INFO

Keywords:

Remote wastewater surveillance
Real-time monitoring
SARS-CoV-2
Optical sensors
Fiber optic sensor
Machine learning

ABSTRACT

In this study, a remote monitoring sewage system based on optical method is presented for the first time. The built-in wastewater surveillance system can perform autonomous monitoring with no requirement of sample collection and its transport to the laboratory. The measurement results can be obtained in real time, the work operation allows continuous or on-demand mode. The study includes design, development and application of a biofunctionalized fiber-optic sensor, as well as engaging machine learning algorithms for measured signals classification. The validated SARS-CoV-2 antibodies sensor has a measurement range of 10^{-12} mg/mL to 10^{-1} mg/mL. Known concentrations of Immunoglobulin G (IgG) from 10^{-6} mg/mL to 10^{-1} mg/mL were added to the tested wastewater samples and then detected by the prepared optical probe. The data obtained were then processed and classified by traditional method and selected machine learning algorithms; the results obtained for the KNeighbors algorithm are Balanced Accuracy of 92.97 % and F1-score of 94.19 %. This study is of significance to establish a system that can effectively monitor the outbreak of potential infections in society.

1. Introduction

The outbreak of the COVID-19 pandemic exposed the lack of efficient public health monitoring and screening techniques. Before control of the situation was regained, due to vaccination programs and restrictions preventing its spread [1–3], huge damage was already done: millions of illness cases and deaths, long-term post-sickness symptoms, inefficient health care problems, economic slowdown, and deterioration of people's mental health - these are just some of the challenges the world is facing today. To prevent similar consequences during possible future epidemic threats, there is a strong need for the development of systems,

able to effectively monitor outbreaks of infectious diseases. Actions targeted at virus hotspots would increase the efficiency of preventing further infections by engaging services and funds in areas requiring intervention.

These actions are characterised by huge potential in the context of possible societal impact. First, fit perfectly into the 2030 Agenda for Sustainable Development of the United Nations and, moving forward, the Sustainable Development Goals, in particular Goal 3 – 'Health' and Goal 6 – 'Water and Sanitation' [4], acting as a blueprint for the global sustainable development plan [5]. Second, such activities are also very much a part of the social responsibility of scientists whose important

* Corresponding author.

E-mail address: malaszcz@pg.edu.pl (M. Szczerska).

<https://doi.org/10.1016/j.snr.2025.100346>

Received 30 October 2024; Received in revised form 28 March 2025; Accepted 30 May 2025

Available online 6 June 2025

2666-0539/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

role is to benefit society through their research [6], especially today in still uncertain post-pandemic reality. Monitoring of chemical pollutants, pathogens and antimicrobial resistance is also required by revised Urban Wastewater Treatment Directive, which was approved by members of European Parliament in April 2024 [7].

One of the most promising approaches for capturing the dynamics and the dissemination of infectious diseases is wastewater surveillance [8,9]. The wastewater-based epidemiology (WBE) method may still passively assess the unbiased trends of COVID-19 burden and may serve as an early warning system, particularly at the time when clinical surveillance in many countries becomes unreliable due to testing shortages. WBE was utilized by numerous research groups as well as by local, regional and national governments [8,10], allowing for the detection of signals from symptomatic and asymptomatic individuals in a more cost-effective and expeditious, than traditional clinical monitoring. It has prompted the European Commission to issue a recommendation for EU member states to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewater [11].

Various research groups have demonstrated the diverse methods of SARS-CoV-2 detection in wastewater [12], e.g.: including the direct RNA extraction from electronegative membranes or after ultrafiltration [13], RT-qPCR [14,15]. Venugopal et al. proposed a surveillance strategy for the early detection of coronavirus in wastewater based on nanofiber technology [16]. The electrospun nanofiber membranes were used as filters to isolate pathogens and screen for disease-causing pathogens. The membranes were bioengineered for specific binding to Sars-CoV-2, ensuring their specificity as potential monitoring-support tool.

However, current manpower-intensive monitoring systems are still characterized by high costs, the deployment of advanced equipment and delays in reporting result to the public. Thus, significant efforts have recently been directed towards replacing point-by-point approaches by the real-time online monitoring. This involves the automatization of measuring points and the development of innovative optical fiber sensors, electrochemical sensors and others suited for the reliable

monitoring of a definite set of contaminants, biological and chemical markers.

The aim of this research is to present the wastewater remote monitoring system to detect SARS-CoV-2 antibodies in liquid wastewater sample by optical method, and to predict the possibility of outbreaks of infections which will limit the spread of the virus in society, as shown in Fig. 1. Antibodies produced after infection or vaccination enter wastewater through bodily fluids [17], making IgG concentration an indicator of community infection and immunity levels, as demonstrated by Stephenson et al. [18], who detected antibodies in urban wastewater, highlighting potential for large-scale monitoring.

Our design includes the application of biofunctionalized fiber-optic sensors. Not only will they assure high sensibility and resistance to harsh measuring conditions, small size and weight to facilitate their installation, but also, they could be integrated with existing fiber-optic networks because of the use of standard telecommunication elements.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Wastewater sample (WWS)

In March 2023, WWSs were collected from the inflow of WWTP (Wastewater treatment plant) situated in northern Poland. This WWTP serves a population of 360 000 residents (440 000 PE) and employs an advanced treatment process that includes mechanical pretreatment and advanced biological nutrient removal, followed by secondary settling tanks. The physical and chemical characteristics of the WWSs were assessed in accordance with the APHA guidelines (2013). The parameters examined included total nitrogen (TN), total Kjeldahl nitrogen (TKN), and inorganic nitrogen compounds ($\text{N}-\text{NH}_4^+$, $\text{N}-\text{NO}_3^-$, $\text{N}-\text{NO}_2^-$), total phosphorus (TP), orthophosphate

($\text{P}-\text{PO}_4^{3-}$), chemical oxygen demand (COD); all of which were determined using a XION 500 spectrophotometer (Dr. Lange, GmbH,

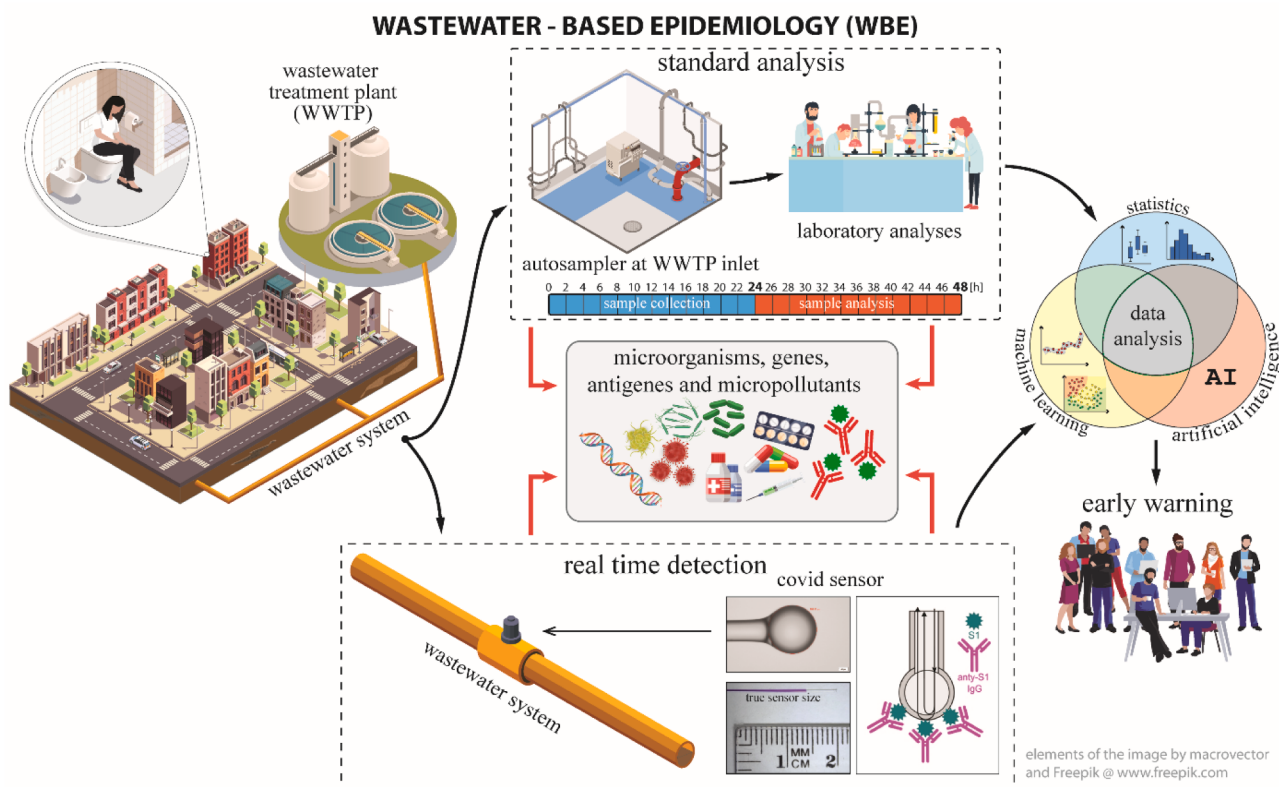


Fig. 1. The concept of the real time wastewater surveillance by fiber-optic sensor to monitor potential epidemic outbreaks.

Germany). Biological oxygen demand over 5 days (BOD₅) was measured using the manometric respirometric BOD OxiTop method. Total suspended solids (TSS) were quantified through a gravimetric technique, and pH, redox potential, and conductivity (cond.) were measured using a portable multiparameter meter (HL-HQ40d multi, HACH, Germany). Information about measured parameters values is presented in the Supplementary – Table S1.

2.2. Methods

2.2.1. Functionalization of the measurement probe

The molecular sieves (3 Å, Pol-Aura, Poland) were activated in an oven (10 h, 350 °C) and cooled, then transferred to a 250 mL glass bottle with tight sealing and filled with dimethyl sulfoxide (molecular biology grade, Merck, Germany) or acetone (molecular biology grade, Merck, Germany) (1:1 (v/v)). Finally, left for 72 h to dehydrate the solvents. The sensor was cleaned extensively by immersing it in H₂O₂/H₂SO₄ (WarChem, Poland; ACS reagent, Merck, Germany, respectively) water solution (10 %, 50 mM respectively at 60 °C) for 30 min. After the cleaning procedure, the optical fiber with a microsphere was then immersed in ultrapure water and finally in anhydrous acetone solution to remove excess moisture (3 times in different solutions, each incubation lasted 10 min in an anhydrous environment).

The cleaned optical fiber was immersed in freshly prepared of 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilane (99 % purity, Merck, Germany) solution in anhydrous acetone for 24 h in anhydrous environment - to cover the optical fiber in amino groups. After the 24 h, the optical fiber was immersed in anhydrous DMSO (3 times, 10 min of incubation) to remove excess APTES solution. The cleaned optical fiber with amino groups on the surface was then immersed in a freshly prepared 10 mM stock solution of NHS-LC-Biotin (95 % purity, Merck, Germany) in anhydrous DMSO and left for 24 h in an anhydrous environment. Finally, after incubation, the sensor was immersed in the 1xPBS (Phosphate buffered saline tablets; Merck, Germany) solution and rinsed several times to remove unbound biotin and DMSO. To immobilize the probe (S1-avidin), the stock solution (10 mM) of S1 domain of spike protein conjugated with an avidin was prepared in 1xPBS and optical fiber was immersed in the solution for 1 hour, then rinsed with 1xPBS. The bio-active layer was fabricated on the microsphere surface [19]. The prepared measurement head is shown in Fig. 2.

2.2.2. Measurement setup

The measurement system was built of a superluminescent diode, an optical signal analyzer and single-mode optical fibers (SMF-28, Thorlabs) and a sensor probe which is shown in Fig. 2b. During the measurements, a signal generated by the broadband light source with a central wavelength of 1310 ± 20 nm (SLD-1310-18-W, FiberLabs Inc., Japan; spectrum width of 52 nm, total output power of 18 mW) was guided through the 2×1 fiber-optic coupler and reflected in the measurement head (operation details in the section below) immersed in the investigated liquid sample. The measurement signal was then recorded using an optical spectrum analyzer (ANDO AQ6319, Yokogawa, Japan; wavelength accuracy of ± 50 pm; resolution bandwidth set to 0.1 nm). The measurement series were done using the sensor with a microsphere created at the end of a standard telecommunication optical fiber.

The measurement probe (Fig. 2a) was immersed for 5 min in the sample of a certain anti-S concentration, which allowed to observe the changes in the intensity of signal during attachment of the antigen to the surface of the sensor. Similarly, the results during the rinsing of the sensor were recorded. The measurements were performed with a probe as a reference. The probe was immersed in the pure 1xPBS solution and then transferred to the dilution of anti-S antibody at 0.01 fg/mL to 100 ng/mL concentration (serial dilutions). The sensor was submerged in the anti-S antibody solution for 5 min. At each stage, every 2 s the optical spectra were registered.

Investigated samples contained various IgG concentrations ranging

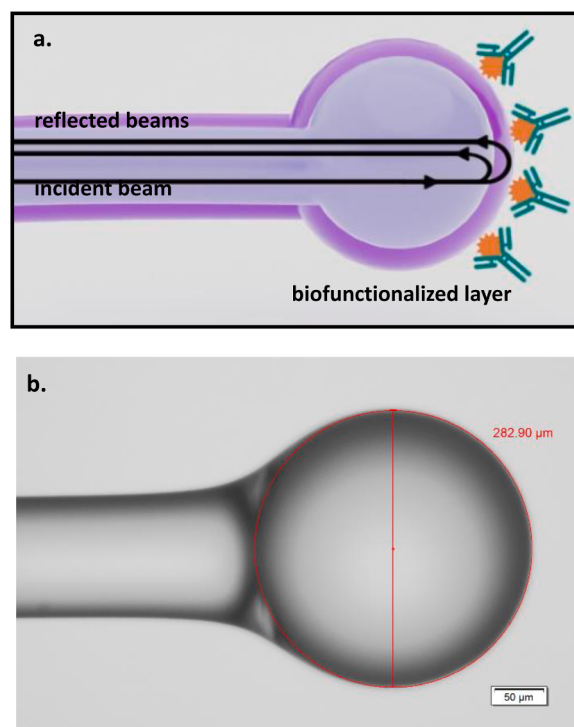


Fig. 2. Measurement fiber-optic probe with a biofunctionalized microsphere: a) the schema of the sensing probe in a working mode. The incident and reflected light beams are marked in black; b) image of the sensing probe.

from 10^{-12} mg/mL to 10^{-1} mg/mL. The decrease of the optical power depends on IgG concentration as shown in Fig. S2. The characteristic is linear from 10^{-12} mg/mL to 10^{-6} mg/mL, and the sensor achieves saturation over 10^{-6} mg/mL.

2.2.3. Data processing

Accurate classification of optical interferograms requires a structured data processing pipeline that transforms raw spectral signals into well-defined feature representations suitable for machine learning. This process involves several interdependent stages, see Fig. 3, each contributing to the reliability and interpretability of the final classification output.

Signal Acquisition

Raw data acquisition was performed using a fiber-optic interferometric sensor operating at a central wavelength of 1310 ± 20 nm. The reflected spectral signal was captured by an optical spectrum analyzer, recording changes in the interference pattern resulting from antibody-antigen interactions at the sensor surface. These interferograms served as the primary input for downstream processing. To obtain accurate and reliable results in machine learning, proper data pre-processing is a key step. The input data must be properly cleaned and transformed so that the model can learn and predict effectively. Raw interferometric spectra were pre-processed to enhance signal quality and reduce noise prior to feature extraction. The primary step involved applying the Savitzky-Golay filter [20,21], a widely used smoothing algorithm that performs local polynomial regression on a sliding window. This method is particularly advantageous for spectroscopic data, as it reduces high-frequency noise while preserving critical features such as peak shape, height, and width — which are essential for reliable peak-based feature extraction.

Additionally, baseline normalization was performed to correct for intensity shifts and standardize the amplitude scale across measurements. This ensured that variations in signal strength due to environmental or instrumental factors did not introduce bias in downstream analysis. The result of this stage was a set of clean, normalized spectra

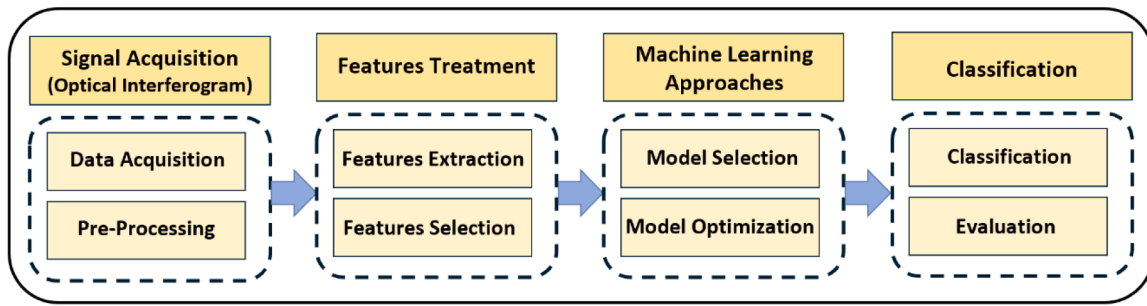


Fig. 3. Block diagram of the data processing pipeline used in the classification of wastewater interferograms.

with preserved analytical features, suitable for robust signal interpretation and classification.

Features Treatment

In the proposed approach, the algorithms used do not take raw data as input. Instead, a feature vector describing the data is used. A total of 54 statistical and morphological features were computed, covering global signal statistics (mean, variance, skewness, kurtosis, entropy), localized measures (within the range of detected peaks), and peak-based morphology descriptors (prominence, width, width-height, inter-peak distances). These features were derived both from the full spectral range and from a bounded range between the first and last significant peaks. The full list of extracted features, along with definitions, is provided in Supplementary Table S2. This extensive representation allowed the subsequent machine learning algorithms to exploit not only intensity variations but also the structural characteristics of the interferometric patterns. To improve model efficiency and generalization, an iterative feature selection process was applied, which was preformed taking into account the previous experience of authors and preliminary tests developed to determine their classification capabilities according to the carried information. This features selection process has resulted in three highly informative features being retained:

- **Peaks_P_Var**: variance of peak prominence, indicating variability in peak salience.
- **Peaks_WH_Max**: maximum peak width-height, characterizing the sharpest spectral features.

- **Peaks_WH_Std**: standard deviation of width-heights, reflecting signal complexity.

These features demonstrated high discriminative power while minimizing redundancy, and were used for training the final classification models.

To help a deeper understanding of the identified features, it is necessary to explain two specific metrics: peak height and peak width. These metrics are essential analytical tools that enable comprehensive exploration and interpretation of interferograms, a visualization of these metrics is shown in Fig. 4.

Peak prominence is a widely used metric in signal processing and data analytics. The prominence of a peak measures how much a peak stands out from the surrounding baseline. **Peak width heights** are the height at which the peak width of the signal is measured.

Machine learning approaches

For classification purposes a diverse group of machine learning models to capture a broad spectrum of classification strategies has been selected, which includes instance-based learning (KNeighborsClassifier), ensemble decision trees (ExtraTreesClassifier), probabilistic inference (GaussianNB), semi-supervised propagation (LabelSpreading), and gradient boosting techniques (LGBMClassifier). This diversity has been selected in order to ensure that the used model evaluation does not rely on a single learning paradigm, but rather explores different algorithmic approaches to identify the most suitable one for the interferometric signal classification task.

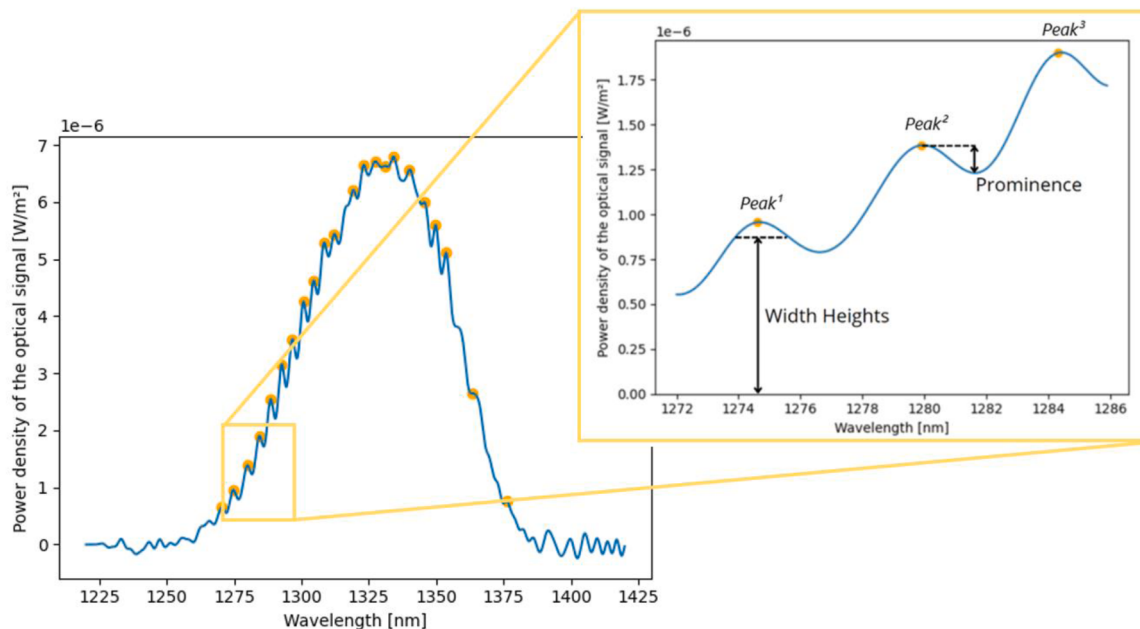


Fig. 4. Graphical explanation of Width Heights and Prominence Metrics.

Each model was initially benchmarked using the LazyPredict library, which enables rapid prototyping and comparative analysis across dozens of algorithms using consistent data preprocessing and evaluation metrics. The selected models demonstrated superior performance in terms of classification accuracy and robustness during the initial screening, justifying their inclusion in the final comparative study.

A key consideration in the selection process was inference latency, as the target application requires real-time or near-real-time operation. In wastewater surveillance, the ability to detect emergent viral markers within seconds can be crucial for timely epidemiological response. As summarized in Table 2, all selected models achieved prediction times on the order of milliseconds to a few hundred milliseconds, making them suitable for deployment in edge or embedded systems connected to in-pipe optical sensors.

Furthermore, deep learning models, due to the relatively small dataset size ($n = 157$ spectra), which limits the generalization capacity of high-parameter neural networks, has intentionally been excluded. In contrast, classical machine learning algorithms can generalize well with limited training data, especially when paired with carefully engineered features. Their lightweight nature, and minimal computational requirements make them ideal candidates for integration in compact, resource-constrained sensor systems. By systematically evaluating performance across diverse model types and emphasizing both classification accuracy and operational feasibility, the selected classification pipeline is optimized for both scientific rigor and field deployment.

LazyPredict was used to initially benchmark 27 classification algorithms, providing a broad overview of different modeling strategies under a unified evaluation framework. This enabled efficient identification of high-performing candidates without manually configuring each model, streamlining the model selection process.

Following initial model selection, a dedicated optimization phase was conducted to improve the performance and generalization capacity of each classifier. The goal of model optimization was to identify the most appropriate hyperparameters for each algorithm, reduce overfitting, and ensure robustness when applied to unseen spectral data from wastewater samples.

The optimization process was performed using a combination of grid search and randomized search strategies, depending on the dimensionality of the hyperparameter space for a given model. All searches were conducted within a cross-validation framework using stratified K-fold validation (typically 5-fold) to preserve the distribution of class labels across training and validation folds, which is especially important in imbalanced datasets.

For each model, the most influential hyperparameters were prioritized:

- KNeighborsClassifier: number of neighbors (`n_neighbors`), distance metric (`p`), and weighting scheme (`weights`).
- ExtraTreesClassifier: number of trees (`n_estimators`), maximum tree depth (`max_depth`), and the number of features considered at each split (`max_features`).
- GaussianNB: no major hyperparameters were tuned, but pre-processing steps (e.g., feature scaling) were evaluated to optimize likelihood estimates.
- LabelSpreading: kernel type (`rbf`, `knn`), gamma value for RBF kernel, and the number of neighbors in graph construction.
- LightGBMClassifier: learning rate (`learning_rate`), number of boosting rounds (`n_estimators`), tree depth (`max_depth`), and number of leaves (`num_leaves`), among others.

Each model's hyperparameter combinations were evaluated based on performance metrics calculated from validation folds, with balanced accuracy and F1-score prioritized due to the moderate class imbalance in the dataset. To mitigate the risk of overfitting to training data, early stopping or regularization parameters (e.g., `min_child_samples` in LightGBM) were also tuned where applicable, as summarized in Table 1.

Table 1
Best Hyperparameter Values for Each Model.

Model	Hyperparameter	Best Value
KNeighborsClassifier	<code>n_neighbors</code>	9
	<code>p</code>	2
	<code>weights</code>	'distance'
ExtraTreesClassifier	<code>n_estimators</code>	200
	<code>max_depth</code>	30
	<code>max_features</code>	'log2'
GaussianNB	–	–
LabelSpreading	(Preprocessing)	StandardScaler applied
	<code>kernel</code>	'rbf'
	<code>gamma</code>	1.0
LightGBMClassifier	<code>n_neighbors</code>	5
	<code>learning_rate</code>	0.01
	<code>n_estimators</code>	300
	<code>max_depth</code>	3
	<code>num_leaves</code>	31
	<code>min_child_samples</code>	10

All optimization tasks were automated using Scikit-learn's GridSearchCV and RandomizedSearchCV, and for LightGBM, the native LightGBM Python API was used with built-in cross-validation functions for fine-tuning.

This multi-model optimization strategy ensured that each classifier operated under conditions that maximized its ability to distinguish between interferometric signals from antibody-positive and antibody-negative samples, while maintaining computational efficiency suitable for real-time deployment in the sensor system.

Classification

In the classification stage, each pre-processed and feature-transformed interferogram was assigned a binary label representing the presence or absence of detectable SARS-CoV-2 antibodies in the wastewater sample. The task was approached as a supervised binary classification problem, where the input to the model was a low-dimensional feature vector derived from the interferometric signal, and the output was a class label: positive (antibody present) or negative (antibody absent or below detection threshold).

The classification pipeline operated on a feature vector consisting of three engineered variables selected through iterative feature selection. These variables reflect variations in peak prominence and peak width characteristics, which encode essential morphological changes in the interferogram due to antibody binding events.

Multiple machine learning algorithms were applied to this task to explore different classification paradigms. The selected classifiers included:

- KNeighborsClassifier: an instance-based learner that classifies new data points based on proximity to labeled training instances in the feature space.
- ExtraTreesClassifier: a randomized ensemble of decision trees that improves robustness and reduces variance through feature subsampling.
- GaussianNB: a probabilistic classifier assuming Gaussian distribution of features, commonly used for low-dimensional and continuous-valued input.
- LabelSpreading: a semi-supervised model based on graph-based label propagation, suitable for scenarios where label sparsity is present.
- LightGBMClassifier: a gradient boosting framework that builds additive models using decision tree learners with a focus on computational efficiency.

Each classifier was trained using stratified sampling to ensure consistent class proportions in both training and validation sets. Feature scaling and transformation were applied where required by model assumptions (e.g., in GaussianNB). All implementations were performed using the scikit-learn and LightGBM Python libraries under a unified

evaluation framework.

To evaluate the models, the following metrics were utilized: accuracy, balanced accuracy, F1 Score, and Time Taken. All these metrics are derived from the confusion matrix (1).

$$M = \begin{pmatrix} TN & FP \\ FN & TP \end{pmatrix} \quad (1)$$

- True negative (TN) Refers to the number of correctly classified negative samples. For example, samples without antibodies have been classified as not containing antibodies.
- True positive (TP) Refers to the number of correctly classified positive samples. For example, samples with antibodies have been classified as containing antibodies.
- False negative (FN) Refers to the number of incorrectly classified positive samples as negative. For example, samples with antibodies have been classified as not containing antibodies.
- False positive (FP) Refers to the number of incorrectly classified negative samples as positive. For example, samples without antibodies have been classified as containing antibodies.

All performance metrics presented in this paper are intended to evaluate the predictive capabilities of the machine learning model using the collected dataset, rather than to evaluate the overall functionality of the fiber optic sensor itself.

Sensitivity measures the ability of the model to detect positive samples, metrics useful in cases where it is particularly important to detect as many positive samples as possible allowing false positive samples. It is calculated from Eq. (2).

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN} \quad (2)$$

Specificity measures the ability of the model to detect negative samples, metrics useful in cases where it is particularly important to detect as many negative samples as possible, allowing false negative samples. It is calculated from Eq. (3).

$$Specificity = \frac{TN}{TN + FP} \quad (3)$$

Precision indicates what percentage is true positive of all positive predictions, a useful metric in cases where it is particularly important to detect only confirmed positive samples, so that the number of False Positives is as low as possible (4).

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (4)$$

F1 Score is a metric created to combine Sensitivity and Precision; it is the harmonic average of these two metrics (5). The use of the harmonic mean rather than the arithmetic mean helps to highlight the weaker score of one of the base metrics.

$$F1 \text{ score} = 2 \cdot \frac{(Precision \cdot Sensitivity)}{Precision + Sensitivity} \quad (5)$$

Accuracy is the basic and simplest metric of model quality, the ratio of correctly classified samples to the total number of samples in the dataset. It offers a general indication of the effectiveness of the model in predicting the correct labels. However, accuracy may not be reliable when confronted with unbalanced datasets (6) [22].

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad (6)$$

Balanced Accuracy addresses the issue of class imbalance. It provides a more accurate evaluation metric when classes have differing sample sizes. Balanced accuracy is the mean of the sensitivity and specificity, resulting in a metric that assigns equal importance to every class (7) [23].

$$Balanced \text{ Accuracy} = \frac{1}{2} (Sensitivity + Specificity) \quad (7)$$

3. Results and discussion

3.1. The establishment of the fiber

In biological systems, a many simple processes can be described by a sigmoidal curve. Especially, the processes that involve the binding reaction of protein to protein. Indeed, as shown in the literature [24], the kinetics of antigen/antibody bonding in the liquid/liquid phase or in the liquid/solid phase can be represented by sigmoidal or hyperbolic type kinetics [25]. The antigen/antibody reactions are considered very fast and specific, due to this nature, in our understanding we should also consider the diffusion parameter of forward and reverse reactions. Reaction between antibodies in 1xPBS solution and with antigen immobilized on a surface of the microsphere could be controlled by the limitation of the antibodies in the vicinity of the head of the microsphere. The forward reaction of forming the complex is limited by the surface reaction, then after some time the region close to the microsphere is depleted of antibodies close to the head sensor and thus diffusion limitation can occur [26]. Additionally, due to the fact that our methodology is measuring indirect effects of antigen/antibody interaction like change in hydrogen bond pattern, water or salt bridges which are being observed by the signal decrease at 1500 or 1300 nm, due to absorption of radiation. Taking the above into consideration, we can expect extremely fast changes of signal intensity over time after immersion of microsphere head in IgG solution similar to hyperbolic or sigmoidal shape. In fact, this is what we have observed during the measurements (Fig. 6).

The measurement series were performed for the prepared liquid samples containing wastewater and antibodies within the concentration range of 10^{-6} – 10^{-1} mg/ml. Within the measurement procedure, the fiber-optic head was immersed in the sample (starting with the lowest IgG concentration) and then rinsed in phosphate buffer solution (PBS). Each sample was measured 10 times. The representative spectra obtained are plotted in Fig. 5.

It can be noted that the signal changes are dependent on the concentration of IgG in the wastewater sample. As the microsphere surface was biofunctionalized, only selected proteins of SARS-CoV-2 specific IgG antibodies are attached to the measurement head. The signal modulation and optical power changes in the reflected signal appear as the antibodies attach to the measurement head surface.

Our research indicates that the sensor, based on S1 protein-coated optical fibers and designed to detect interactions with IgG antibodies against SARS-CoV-2 S1, demonstrates high specificity. If detection of proteins of the size of IgG was possible, the sensor can effectively recognize receptor-antigen interactions when immobilized on the fiber surface. Our experimental results show that due to interactions with antibodies, the sensor exhibits high selectivity. The lack of significant binding of other molecules from the wastewater to the fiber surface is clearly evident in the data obtained both from PBS controls and from wastewater samples supplemented with IgG. If our sensor was not specific, the complex matrix of wastewater, containing numerous potential interfering substances, would likely reveal this issue. However, our measurements do not indicate significant nonspecific interactions, thus confirming the high selectivity and efficacy of the sensor under the intended conditions.

3.2. The traditional data analysis procedure

The information about the measured sample is encoded in the optical interference spectrum. Signal analysis can be based on overall intensity changes or specific spectral features (e.g., the number of fringes or the spacing between interference maxima). In some cases – for example,

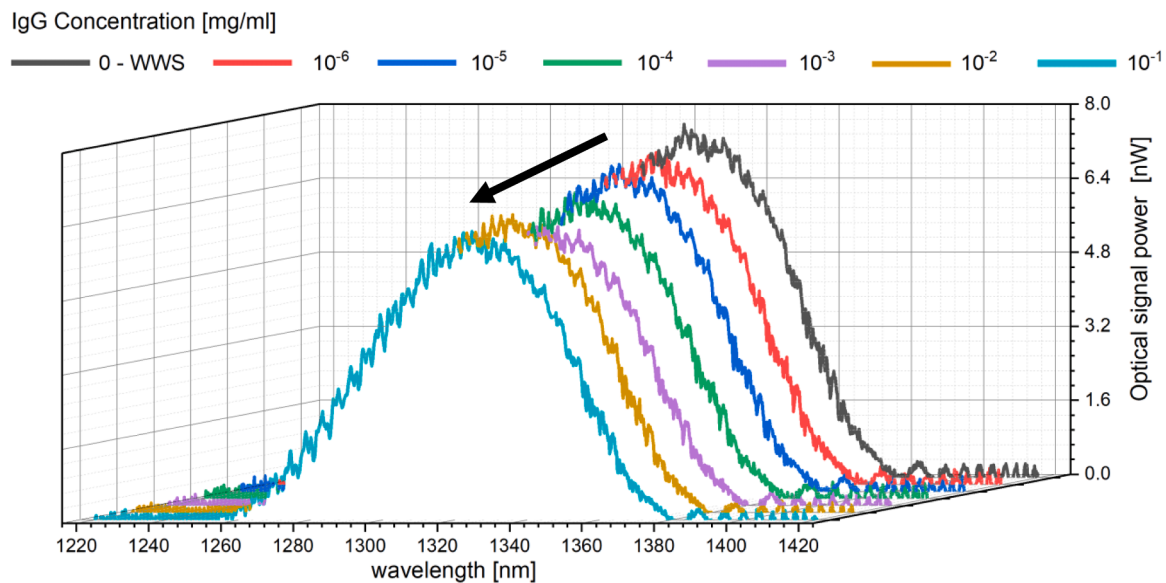


Fig. 5. Representative measurement spectra for wastewater samples with known IgG level. The waterfall plot shows averaged spectra (avg from 10 signals for a given IgG concentration).

when analyzing prepared standard solutions – a simple analysis of a single parameter can be sufficient. Fig. 6 shows how the maximum optical power of the sensor signal varied with antibody concentration: the smallest IgG concentration (10^{-6} mg/mL) produced the highest optical power (7.18 nW), and the power decreased for higher IgG concentrations, exhibiting a sigmoidal trend as described above. It can be noted that a simple classification based on a threshold (illustrated by the horizontal line in Fig. 6) could be attempted, but its accuracy and reliability would be very limited because it considers only one parameter of the signal.

In our study, we performed a comparison between a traditional threshold-based classification method and machine learning algorithms, using a total of 157 collected spectra. We labeled 68 of these as “positive” (antibodies present, defined as IgG concentration $\geq 10^{-4}$ mg/mL) and the remaining 89 as “negative” (antibodies not present or below 10^{-4} mg/mL). For the traditional classification based on a single threshold (as depicted in Fig. 6, considering only the peak optical power), the overall accuracy was only 38.9 %. The interferograms of

both positive and negative samples overlapped significantly (see Fig. 5), making this one-parameter method highly unreliable. In other words, many antibody-containing samples were misclassified when using just an optical power cutoff. This demonstrates that relying on only one signal feature is insufficient for robust detection. As a result, we turned to machine learning techniques as an alternative, aiming to utilize multiple features of the signal for more reliable classification.

3.3. Optimization by machine learning

To enable machine learning classification, each recorded spectrum was converted into a feature vector that captures key characteristics of the interferometric signal. Rather than using raw spectral data directly, a set of descriptive features from each interferogram has been extracted. Through an iterative feature engineering and selection process (detailed in the Supplementary Material), authors identified three features as the most informative for distinguishing positive vs. negative samples: (1) the variance of the peak prominence, (2) the maximum peak width at half-maximum of the interference fringes, and (3) the standard deviation of the peak widths at half-maximum. These features effectively capture how the presence of antibodies alters the shape and intensity distribution of the interference pattern.

Fig. 7 illustrates the model accuracy achieved using all extracted features compared to using only this optimized subset of three features. Notably, focusing on the top three features yields nearly the same accuracy as using the full feature set, confirming that these chosen features retain most of the relevant information in the signal.

Furthermore, Fig. 8 shows the relative importance of each individual feature for the KNeighborsClassifier model. This analysis provides insight into how each feature contributes to the model’s predictions and validates our feature selection approach by showing that the identified features are indeed the dominant drivers in the classification decision.

After defining the feature set, authors evaluated a variety of machine learning algorithms for the classification task. An initial screening with a broad range of algorithms (using the LazyPredict library in Python) identified the top performers, and from these we selected a few representative models for detailed comparison. Authors chose to examine the k-Nearest Neighbors classifier (KNeighborsClassifier), an ExtraTrees ensemble classifier, Gaussian Naïve Bayes, and a LightGBM gradient-boosted tree classifier. These models were selected because they yielded high performance in preliminary tests and they represent diverse

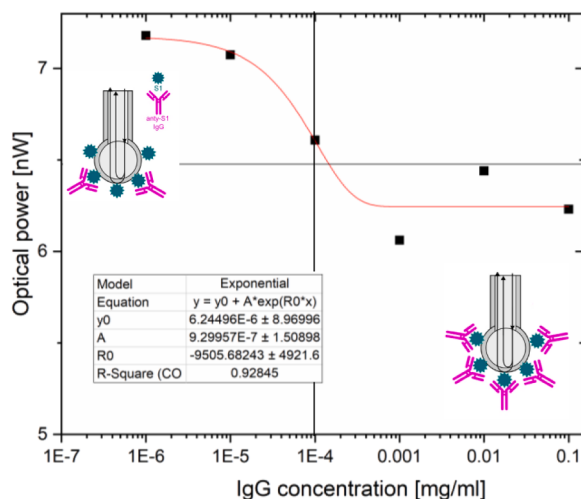


Fig. 6. Maximum optical power in a function of antibodies concentration in the waste water sample from 10^{-6} to 10^{-1} . Exponential fit is marked in red with the equation and parameters added in the table. Black horizontal line is to guide the eye through potential classification condition.

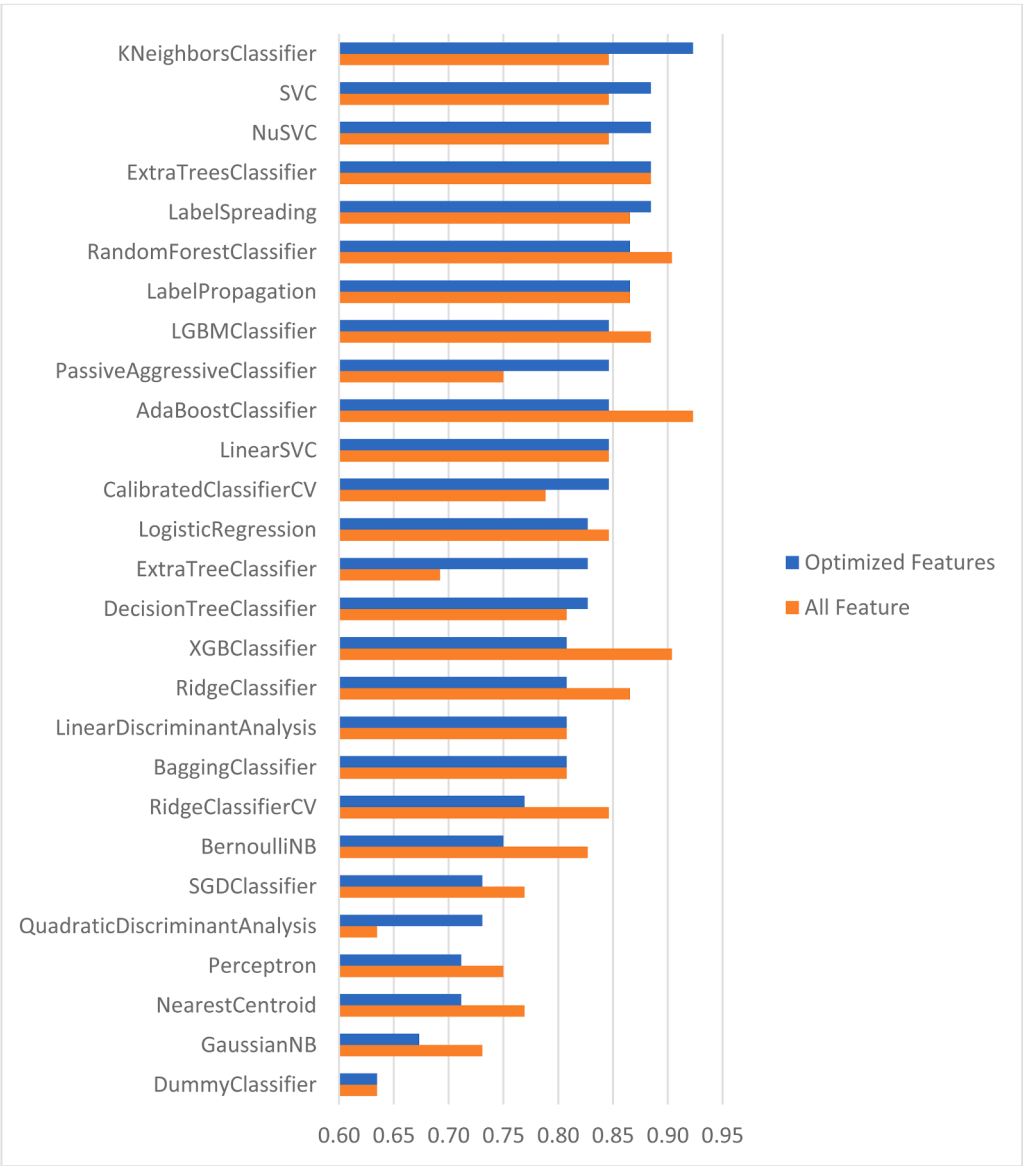


Fig. 7. Classification accuracy for specific algorithms.

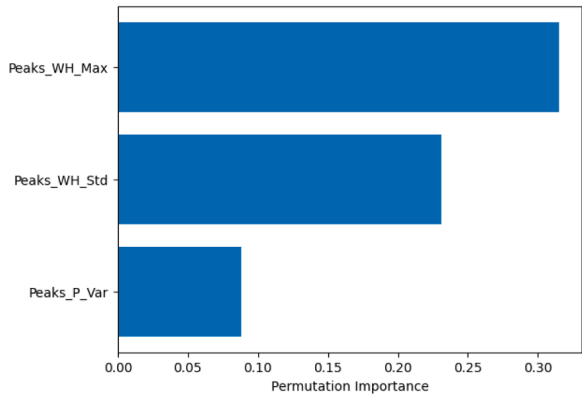


Fig. 8. Importance of individual features for the KNeighbors algorithm.

classification strategies (instance-based, ensemble tree-based, probabilistic, and boosting, respectively). In addition, all of these algorithms offer relatively fast prediction times, supporting the goal of real-time

monitoring. Table 2 summarizes the performance of the selected models in terms of Accuracy, Balanced Accuracy, F1 Score, and inference time. All of the machine learning models significantly outperformed the traditional threshold method, with accuracies up to ~94 % (versus ~39 % for the threshold approach). The balanced accuracy metric is reported because it accounts for the imbalance between the classes, and the F1 score is reported as it provides a single measure that balances precision and recall. The inference times (on the order of only a few tenths of a second or less) demonstrate that these methods are feasible for near-real-time implementation.

The KNeighbors classifier achieved the highest performance among

Table 2
Performance metrics for selected models.

Model	Accuracy	Balanced Accuracy	F1 Score	Time taken
KNeighborsClassifier	94.23 %	92.97 %	94.19 %	0.04 s
ExtraTreesClassifier	92.31 %	92.81 %	92.39 %	0.28 s
GaussianNB	90.38 %	90.03 %	90.44 %	0.02 s
LabelSpreading	90.38 %	88.73 %	90.32 %	0.05 s
LGBMClassifier	88.46 %	87.25 %	88.46 %	0.16 s

the tested models, with a balanced accuracy of 92.97 % – whereas the traditional threshold method did not even reach 40 % on this metric. This result underscores KNeighbors' ability to effectively handle the class imbalance in our dataset (balanced accuracy gives equal weight to positive and negative classes). Moreover, the F1 score of 94.19 % confirms the model's excellent precision and recall, indicating a well-balanced classification that minimizes both false negatives and false positives. In practical terms, the KNeighbors model is able to detect positive samples without excessively mislabeling negative samples, which is crucial for a reliable surveillance system.

The shortcomings of the threshold-based approach are further illustrated by the confusion matrix for the traditional method (Fig. 9). Out of 68 positive (antibody-containing) samples, only 15 were correctly identified as positive (true positives), while the remaining 53 positive samples were misclassified as negative. This corresponds to an extremely high false-negative rate – the vast majority of actual positive cases would be missed by using a single-threshold classifier. Such poor sensitivity underscores why the simple one-parameter classification is inadequate for this application.

By contrast, Fig. 10 shows the confusion matrix for the KNeighborsClassifier, demonstrating the greatly improved performance of the machine learning approach. In the test dataset, 16 out of 17 antibody-negative samples were correctly classified as negative (true negatives), with only 1 being misclassified as a false positive. Similarly, 33 out of 35 antibody-positive samples were correctly identified as positive (true positives), with only 2 false negatives. This result translates to a much higher true positive rate and substantially lower false negative rate compared to the traditional method. Overall, the side-by-side comparison of Figs. 9 and Fig. 10 highlights how the machine learning model dramatically reduces misclassification errors relative to the simple threshold method. These figures visually confirm that our ML-driven system can accurately distinguish between positive and negative samples, whereas the conventional threshold approach fails to do so.

In addition to improved accuracy, the machine learning approach offers the advantage of autonomous, real-time operation. Wastewater surveillance is increasingly important for public health monitoring and controlling virus spread [23,24]. Until now, SARS-CoV-2 biomarkers in wastewater have been detected primarily by laboratory methods (like RT-qPCR), which require collecting samples, transporting them to a lab, and performing time-consuming analyses by trained personnel. This makes the process costly and slow. The biggest advantage of the presented sensor system is the possibility of installing it directly in a wastewater pipe to perform label-free, on-demand measurements in real time. In other words, the system can continuously monitor wastewater on-site, providing immediate detection of target biomarkers without the need for manual sample handling. This real-time capability could enable

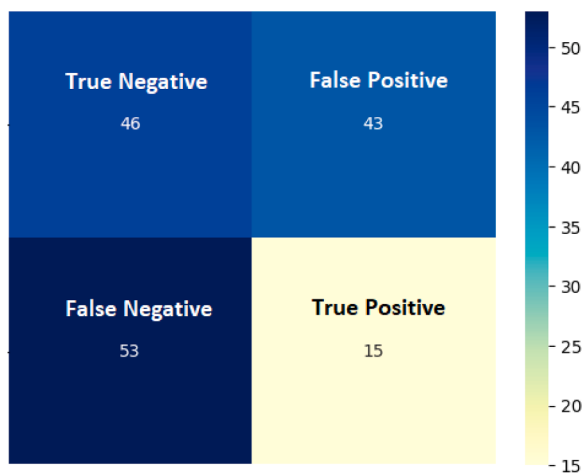


Fig. 9. Confusion matrix for traditional method.



Fig. 10. Confusion matrix for KNeighborsClassifier with test data set.

health authorities to respond much faster to emerging infection outbreaks.

The idea of such monitoring has been reported in the literature [27, 28] presenting how to expand that system, reporting number of sensors needed, and their placement in the wastewater system to obtain the optimal sewage SARS-CoV-2 monitoring system. However, the authors of that work did not deliver any information about the sensors which can be used in such a system. From this time, a few constructions of the SARS-CoV-2 sensors have been developed and presented as sensors dedicated for wastewater samples analysis. There are mainly electrochemical sensors, and even though they are an interesting solution, they require sample to be collected, pre-treated and placed properly on the electrodes.

A few groups reported electrochemical sensing of the SARS-CoV-2 RNA in wastewater samples [29,30], on the other hand in work [31], the developed electrochemical sensors for detecting the specific genes of the virus are presented. Guerrero-Esteban T. et al. presented electrochemical sensors of SARS-CoV-2 Spike 1 in urban wastewater samples [32]. A nucleic acid-based polymerase chain reaction (PCR) assay was reported for SARS-CoV-2 determination in sewage [33]. It assures high sensitivity and specificity, but at the cost of a complicated procedure and a long analysis. A platform for the SARS-CoV-2 Spike S1 protein was developed as an electrochemiluminescence immunosensor reaching limit of detection of 1.2 pg/ml [34].

Tian et al. obtained limit of SARS-CoV-2 viral detection at the level of 260 TU/μL with the use of the Surface Enhanced Raman Scattering [35], however it should be recognised that even this is optical method, the sample needs pre-treatment and the measuring procedure takes 40 min. Furthermore, it is done by the use of Raman Spectroscopy which is expensive optical metrology device. Alafeef et al. presented fluorescence the SARS-CoV-2 viral sensors with short measurement time of 15 min, however the samples must be collected and dropped on the sensing assay [36].

As it was presented above, until now only a few sensors have been dedicated to work with such a complex biological matrix as wastewater. Typically, the wastewater surveillance follows the same steps, with the most important being sampling, the examination of sample and data analysis [37,38]. Only two solutions are based on the optical sensing, however, only our solution is fiber-optic based sensor and by the use of the telecommunication wavelength, gives the opportunity to join the sensor with internet world-wide network. Furthermore, none of the presented solutions can offer advantages of our system: continuous, real-time and label-free monitoring of the wastewater parameters. This gives opportunity for constant investigation of epidemiology situation and allows quick and purposeful reaction of the sanitary system.

The fiber optic network is reaching almost every public building in

this wired world; hence it can be strategically used for data collection. However, the fiber-optic sensors are rarely used to investigate the parameters of water. To date, the conducted research focused on clean water in applications such as security [39], drinking water organic or inorganic pollutants recognition [40], or water physical parameters examination such as temperature or salinity [41].

Due to the fact that wastewater seems to be a very harmful and complex optical matrix, to the best knowledge of authors of this research, the presented solution is the first where the fiber optic sensor is developed for detection of antibodies in the wastewater surveillance. It is in line with key requirements of the revised Urban Wastewater Treatment Directive [7], which mandates the monitoring of public health-relevant parameters such as emerging pathogens (including SARS-CoV-2, influenza and poliovirus) as well as the presence and removal of antimicrobial-resistant (AMR) bacteria and genes. The Directive also introduces increasing targets for real-time monitoring.

The accuracy, robustness and reliability of the proposed real-time monitoring system need to be tested in the challenging conditions of the sewer network. It is believed, however, that fiber optic sensors supported by machine learning can ensure data reliability and resolution even if wastewater flow, level and chemistry is continuously changing.

Practical considerations for real-world deployment: While our results demonstrate the system's capabilities in a controlled setting, deploying this fiber-optic sensor in real wastewater environments will require addressing several environmental factors. Wastewater is a complex and harsh medium – it is often highly turbid, carrying suspended solids that can scatter or absorb light and potentially obscure the sensor's optical signal. Flow conditions in sewer pipes can vary (e.g., changes in flow rate or water level), which might affect the sensor's immersion or the stability of the optical measurements. Additionally, long-term operation will introduce the challenge of biofouling: the buildup of biological material and debris on the sensor probe can attenuate the signal or alter the sensor's response over time.

We anticipate that the machine learning component of our system can help compensate for some of these issues by distinguishing true signal changes from noise or baseline drift. For example, the model can be retrained or calibrated with new data to account for gradual signal attenuation due to fouling or increased turbidity, thus maintaining accuracy as conditions evolve. Nonetheless, proactive engineering measures are crucial to ensure reliable long-term performance. The sensor probe could be enclosed in a protective casing or equipped with a self-cleaning mechanism (such as periodic flushing, mechanical wipers, or anti-fouling coatings) to minimize the accumulation of deposits on the optical surfaces. Implementing a routine maintenance schedule (for instance, periodic inspection and cleaning of the probe) would help sustain sensor sensitivity. It may also be beneficial to integrate reference measurements – for instance, using an optical reference channel or turbidity sensor – so that the system can correct for signal variations caused by changes in turbidity or flow. By taking these precautions, the accuracy, robustness, and reliability of the proposed real-time monitoring system can be preserved even under the challenging conditions of a sewer network. In summary, we are confident that with proper mitigation strategies in place, a fiber-optic sensor supported by a robust machine learning model can deliver consistent and reliable wastewater surveillance data, despite the inevitable fluctuations in wastewater composition and flow in real-world deployments.

4. Conclusion

In this work, authors have demonstrated the ability to implement fiber-optic sensors for the detection of antibodies in wastewater, and have showed that combining the sensor with machine learning greatly improves the classification of the measured signals. There is a clear relationship between the quantity of antibodies in the sample and the optical interference signal obtained from the sensor. The application of machine learning algorithms helped organize and interpret these signals

in a far more reliable way than a simple threshold rule. In fact, the trained models were able to effectively discern between samples containing antibodies and those lacking antibodies, greatly outperforming the conventional threshold-based classification approach. The successful implementation of data preprocessing techniques – notably the careful selection of meaningful features – contributed to the models' strong predictive performance (with the KNeighbors classifier achieving an F1 score above 94 %). This research thus demonstrates the potential of using biofunctionalized fiber-optic sensors, paired with machine learning, to achieve continuous real-time monitoring for wastewater-based epidemiology (WBE). Such a system can serve as an early warning tool for public health, capable of detecting emerging pathogens in the community through the sewage network in a timely manner.

The greatest advantages of the proposed solution are its practicality and wide applicability, which could have a positive impact on public health and safety. The remote real-time wastewater monitoring system we present can be deployed in a variety of settings – not only healthcare facilities (hospitals, hospices, nursing homes), but also educational institutions (universities, schools, kindergartens) and other public spaces (government offices, airports, shopping centers, etc.) – essentially anywhere large groups of people converge. By enabling continuous in situ monitoring of wastewater, the system provides the opportunity for constant epidemiological surveillance and a prompt, targeted response by public health authorities when unusual signals (such as a sudden increase in viral biomarkers) are detected. Ultimately, widespread implementation of such fiber-optic sensor networks, supported by machine learning analysis, could significantly strengthen our ability to prevent and control outbreaks of infectious diseases.

The results would support national government policies to meet their commitment to effectively monitor and prevent outbreaks of infectious diseases. It is believed that further optical sensors can be developed for monitoring of various chemical pollutants and microplastics supporting EU's zero pollution action plan [42] and Sustainable Development Goals of the United Nations, specifically those aimed at promoting sustainable and smart water management, as well as health and quality of life for all.

CRediT authorship contribution statement

Małgorzata Szczerska: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Kacper Cierpiak:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Monika Kosowska:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Paweł Wityk:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Sebastián García-Galán:** Writing – review & editing. **Patryk Sokółowski:** Investigation. **Sylwia Fudala-Książek:** Writing – review & editing, Visualization, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Michał T. Tomczak:** Writing – review & editing, Writing – original draft. **Bei Ye:** Writing – review & editing. **Aneta Łuczkiewicz:** Writing – original draft, Supervision, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by the Ministry of Education and Science under the project NdS/551425/2022/2022. The study was also supported by 7/1/2024/IDUB/III.4c/Tc grant under the TECHNETIUM

Talent Management Grants. The authors acknowledge the financial support of the DS Programs of the Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of the Gdańsk University of Technology, and BioTechMed Center.

Special thanks to PhD. eng. Wojciech Artichowicz for his help in preparing the graphical abstract.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.snrr.2025.100346](https://doi.org/10.1016/j.snrr.2025.100346).

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] CDC, COVID-19 and Your Health, Centers for Disease Control and Prevention, 2020.
- [2] X. Chen, H. Huang, J. Ju, et al., Impact of vaccination on the COVID-19 pandemic in U.S. states, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1554.
- [3] V. Alfano, S. Ercolano, The efficacy of lockdown against COVID-19: a cross-country panel analysis, *Appl. Health Econ. Health Policy* 18 (2020) 509–517.
- [4] Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development |, Department of Economic and Social Affairs, United Nations, 2015.
- [5] B. Fu, J. Zhang, S. Wang, et al., Classification-coordination-collaboration: a systems approach for advancing Sustainable Development Goals, *Natl. Sci. Rev.* 7 (2020) 838–840.
- [6] C. Gu (顾超), Chih-chen Wang: the social responsibility of scientists, *Natl. Sci. Rev.* 8 (2021) nwaa299.
- [7] New EU Rules to Improve Urban Wastewater Treatment and Reuse | News |, European Parliament, 2024.
- [8] E.L.P.E. Geubbels, J.A. Backer, F. Bakhshi-Raiez, et al., The daily updated Dutch national database on COVID-19 epidemiology, vaccination and sewage surveillance, *Sci. Data* 10 (2023) 469.
- [9] N. Sharara, N. Endo, C. Duvallet, et al., Wastewater network infrastructure in public health: applications and learnings from the COVID-19 pandemic, *PLOS Global Public Health* 1 (2021) e0000061.
- [10] A.C. Singer, J.R. Thompson, C.R.M. Filho, et al., A world of wastewater-based epidemiology, *Nat Water* 1 (2023) 408–415.
- [11] EUR-Lex - 32021H0472 - EN - EUR-lex, 2021.
- [12] M.V.A. Corpuz, A. Buonerba, G. Vigliotta, et al., Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods, *Sci. Total Environ.* 745 (2020) 140910.
- [13] W. Ahmed, N. Angel, J. Edson, et al., First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community, *Sci. Total Environ.* 728 (2020) 138764.
- [14] A. Nemudryi, A. Nemudraia, T. Wiegand, et al., Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater, *CR Med* 1 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.xcrim.2020.100098>.
- [15] F. Wu, J. Zhang, A. Xiao, et al., SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases, *mSystems* 5 (2020), <https://doi.org/10.1128/msystems.00614-20>.
- [16] A. Venugopal, H. Ganesan, S.S. Sudalaimuthu Raja, et al., Novel wastewater surveillance strategy for early detection of coronavirus disease 2019 hotspots, *Current Opinion Environ. Sci. Health* 17 (2020) 8–13.
- [17] D. Zhang, S.S.F. Duran, W.Y.S. Lim, et al., SARS-CoV-2 in wastewater: from detection to evaluation, *Mater. Today Adv.* 13 (2022) 100211.
- [18] S. Stephenson, W. Eid, C.H. Wong, et al., Urban wastewater contains a functional human antibody repertoire of mucosal origin, *Water Res.* 267 (2024) 122532.
- [19] M. Szczerska, P. Wityk, P. Listewnik, The SARS-CoV-2 specific IgG antibodies biophotonic sensor, *J. Biophotonics* 16 (2023) e202200172.
- [20] Savitzky Abraham, M.J.E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639.
- [21] L.U. Yi-bing, L.I.U. Wen-qing, Z. Yu-jun, et al., An adaptive hierarchical Savitzky-Golay spectral filtering algorithm and its application, *gpxygpfx* 39 (2019) 2657.
- [22] S.A. Hicks, I. Strümke, V. Thambawita, et al., On evaluation metrics for medical applications of artificial intelligence, *Sci. Rep.* 12 (2022) 5979.
- [23] M.-A. Moreno-Ibarra, Y. Villuendas-Rey, M.D. Lytras, et al., Classification of diseases using machine learning algorithms: a comparative study, *Mathematics* 9 (2021) 1817.
- [24] E.E.M.G. Loomans, A.J.M. Roelen, H.S. Van Damme, et al., Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Immunol. Methods* 184 (1995) 207–217.
- [25] M. Stenberg, H. Nygren, Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces, *J. Immunol. Methods* 113 (1988) 3–15.
- [26] A. Sadana, A.M. Beelaram, Antigen-antibody diffusion-limited binding kinetics of biosensors: a fractal analysis, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 301–316.
- [27] M. Nourinejad, O. Berman, R.C. Larson, Placing sensors in sewer networks: a system to pinpoint new cases of coronavirus, *PLoS One* 16 (2021) e0248893.
- [28] K. Mao, H. Zhang, Z. Yang, An integrated biosensor system with mobile health and wastewater-based epidemiology (iBMW) for COVID-19 pandemic, *Biosens. Bioelectron.* 169 (2020) 112617.
- [29] M.S. Kumar, R. Nandeshwar, S.B. Lad, et al., Electrochemical sensing of SARS-CoV-2 amplicons with PCB electrodes, *Sens. Actuators B* 343 (2021) 130169.
- [30] P. Sen, Z. Zhang, P. Li, et al., Integrating water purification with electrochemical aptamer sensing for detecting SARS-CoV-2 in wastewater, *ACS Sens* 8 (2023) 1558–1567.
- [31] R.G. Ramirez-Chavarria, E. Castillo-Villanueva, B.E. Alvarez-Serna, et al., Loop-mediated isothermal amplification-based electrochemical sensor for detecting SARS-CoV-2 in wastewater samples, *J. Environ. Chem. Eng.* 10 (2022) 107488.
- [32] T. Guerrero-Esteban, C. Gutiérrez-Sánchez, A.M. Villa-Manso, et al., Sensitive SARS-CoV-2 detection in wastewaters using a carbon nanodot-amplified electrochemiluminescence immunosensor, *Talanta* 247 (2022) 123543.
- [33] D. Barceló, Wastewater-based epidemiology to monitor COVID-19 outbreak: present and future diagnostic methods to be in your radar, *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 2 (2020) 100042.
- [34] T. Guerrero-Esteban, C. Gutiérrez-Sánchez, A.M. Villa-Manso, et al., Sensitive SARS-CoV-2 detection in wastewaters using a carbon nanodot-amplified electrochemiluminescence immunosensor, *Talanta* 247 (2022) 123543.
- [35] C. Tian, L. Zhao, G. Qi, et al., One-pot and rapid detection of SARS-CoV-2 viral particles in environment using SERS aptasensor based on a locking amplifier, *Sens. Actuators B* 371 (2022) 132445.
- [36] M. Alafeef, K. Dighe, P. Moitra, et al., Monitoring the viral transmission of SARS-CoV-2 in still waterbodies using a lanthanide-doped carbon nanoparticle-based sensor array, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10 (2022) 245–258.
- [37] CDC, National Wastewater Surveillance System, Centers for Disease Control and Prevention, 2023.
- [38] M.B. Diamond, A. Keshaviah, A.I. Bento, et al., Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses, *Nat. Med.* 28 (2022) 1992–1995.
- [39] A. Ren, A. Zahid, D. Fan, et al., State-of-the-art in terahertz sensing for food and water security – A comprehensive review, *Trends Food Sci. Technol.* 85 (2019) 241–251.
- [40] L. Jiao, N. Zhong, X. Zhao, et al., Recent advances in fiber-optic evanescent wave sensors for monitoring organic and inorganic pollutants in water, *TrAC Trends Anal. Chem.* 127 (2020) 115892.
- [41] H. Liang, J. Wang, L. Zhang, et al., Review of optical Fiber sensors for temperature, salinity, and pressure sensing and measurement in seawater, *Sensors* 22 (2022) 5363.
- [42] Zero Pollution Action Plan, European Commission, 2024.

RESEARCH ARTICLE

Optical method supported by machine learning for urinary tract infection detection and urosepsis risk assessment

Paweł Wityk^{1,2}  | Patryk Sokołowski³ | Małgorzata Szczerska^{1,3}  |
Kacper Cierpiak³ | Beata Krawczyk^{1,2} | Michał J. Markuszewski¹

¹Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

²Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

³Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

Correspondence

Paweł Wityk, Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, 80-416, Gdańsk, Poland.
Email: pawel.wityk@gumed.edu.pl

Funding information

Excellence Initiative—Medical University of Gdańsk; Ministry of Education and Science; National Science Center

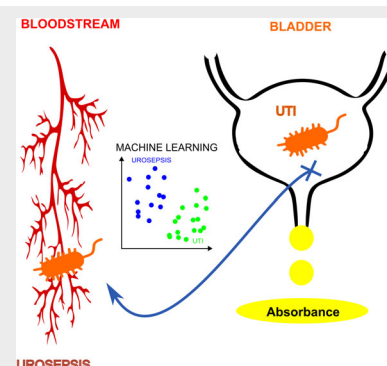
Abstract

The study presents an optical method supported by machine learning for discriminating urinary tract infections from an infection capable of causing urosepsis. The method comprises spectra of spectroscopy measurement of artificial urine samples with bacteria from solid cultures of clinical *E. coli* strains. To provide a reliable classification of results assistance

of 27 algorithms was tested. We proved that it is possible to obtain up to 97% accuracy of the measurement method with the use of machine learning. The method was validated on urine samples from 241 patients. The advantages of the proposed solution are the simplicity of the sensor, mobility, versatility, and low cost of the test.

KEYWORDS

E. coli, machine learning, optical method, spectroscopy, urine, urosepsis



1 | INTRODUCTION

Sepsis is one of the causes of morbidity and mortality in hospitals. It is estimated that about a quarter of all sepsis cases is due to urinary tract infection (UTI) [1, 2]. Prompt administration of the appropriate drug (antibiotic) targeting the correct causative agent (bacterium) increases the chance of patient survival.

The Society of Critical Care Medicine and the European Society of Intensive Care Medicine established a sepsis council and in 2016 a new definition of sepsis was published, calling the guidelines

SEPSIS-3 [3]. According to the current definition, “Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by an abnormal (deregulated) response of the body to infection (bacterial, fungal, viral).” When the SOFA [4, 5] value increases by at least 2 points, the risk of mortality is estimated at about 10% with suspected infection. It is estimated that there are about 49 million cases of sepsis per year, with a mortality rate exceeding 23%, which is 20% of all deaths worldwide [6]. Due to its widespread prevalence, high mortality, and costs related to both treatment and subsequent consequences of sepsis, it is both a medical and economic problem on a global

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Biophotonics* published by Wiley-VCH GmbH.

scale. Hence, in May 2017, the World Health Assembly (WHA), as the executive body of the WHO, adopted an important resolution on sepsis, intended to encourage member countries to make a joint effort to prevent, diagnose and treat it. Due to its widespread prevalence, high mortality, and costs related to both treatment and subsequent consequences of sepsis, it is both a medical and economic problem on a global scale. Hence, in May 2017, the WHA, as the executive body of the WHO, adopted an important resolution on sepsis, intended to encourage member countries to make a joint effort to prevent, diagnose and treat it.

Bacterial infections, especially those related to the urinary tract, are the most common cause of sepsis. *Escherichia coli* is most often responsible for urosepsis, accounting for as much as 52% of cases, followed by bacteria belonging to *Proteus* spp. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., and *P. aeruginosa* [7]. *E. coli* causes inflammation of the bladder, which can progress to acute phase pyelonephritis (15%–50% of cases), and 12% of these patients later develop bacteremia and sepsis. For UPEC infections, the possibility of frequent relapses and complications is observed. It is estimated that UTIs account for about 10%–20% of all community-acquired infections and about 40%–50% of nosocomial infections [8–10].

The presence of bacteria or their products in the urinary tract stimulates a rapid immune response, cytokines are produced and the neutrophil influx is observed, pro-inflammatory interleukins (IL-6, IL-8, TNF- α) and nitric oxide production are produced and nitric oxide is produced [11–15]. But it is the factors from the TLR family that recognize uropathogens that initiate an effective immune response. The epithelial cells of the bladder show a high expression of TLR 4, while the expression of TLR 4 in the epithelial cells of the kidney is low, which makes the response to uropathogenic bacteria much weaker [16, 17] and the kidney-blood barrier may be overcome.

Sepsis diagnosis—in bedside practice, a shortened version of the parametric test SOFA, the so-called Quick-SOFA, allows one to quickly assess the condition of a patient with an infection. This approach does not require complicated equipment, but only a device for measuring blood pressure and observing the patient (altered state of consciousness, systolic arterial pressure < 100 mmHg, and respiratory rate per minute (≥ 22)). Identification of the etiological agent of sepsis and defining the cause is essential to institute appropriate treatment. Each hour of delay, for example, in the administration of antibiotics, reduces the survival rate among patients by an average of 7.6%/h [7]. In the case of bacteremia, the number of bacteria in the blood may be below 10 CFU/mL, hence such a low value significantly hinders diagnosis [18]. Therefore, it

is crucial to use sensitive and specific as well as quick diagnostic methods to detect the causative agent of sepsis and to introduce appropriate therapy, which will increase the survival rate of patients with suspected sepsis.

The method of blood culture on appropriate culture media called “blood cultures,” has been treated for many years as the “gold standard” in the diagnosis of sepsis. Blood cultures are performed for the detection of viable sepsis organism(s) and large hospital laboratories use automated continuous blood culture monitoring systems (BACTEC™ FX/9000, Becton Dickinson, NJ), colorimetry (BacT/ALERT, bioMérieux, France) or pressure variations associated with the release and consumption of gases (VersaTREK, TREK Diagnostic Systems, OH, USA). However, only 30% of sepsis patients can culture the bacteria/fungi responsible for sepsis [19]. This is because the number of microorganisms present in the circulation during bloodstream infection is usually low, ranging from 1 to 1×10^4 CFU/mL. In addition, false-negative blood cultures may be the result of too small a volume of blood taken for testing [20]. In addition, the drug sensitivity assessment is most quickly available after 24–72 h. However, it should be noted that current sepsis treatment guidelines promote the initiation of antibiotic treatment within 1–3 h. Therefore, antibiotic therapy is empirical and is intentionally used as a broad-spectrum therapy to avoid overlooking the pathogen's sensitivity to the drug.

Currently, the commonly used method to differentiate generalized inflammatory reaction from sepsis is CRP protein determination combined with procalcitonin (PCT) in a patient blood [21]. For this purpose, in the laboratory immunofluorescent assay can be used and the immunochromatographic point-of-care test for the determination of PCT [22]. However, for the sepsis diagnosis PCT test has the highest accuracy with an approximate 80%–90% sensitivity for the identification of serious bacterial infections, the peak levels of PCT occur 24–48 h after sepsis [23–25].

To diagnose and implement appropriate treatment for urinary tract infections as quickly as possible, there is a need to provide a rapid and inexpensive means of diagnosing such infections, especially one that allows differentiation of uropathogenic *E. coli* strains (UPEC). In this paper, we present the method of discriminating urinary tract infections from urinary tract infections capable of causing urosepsis. The proposed method is based on absorption, allowing the determination of the changes in radiation intensity, similar to the solutions previously described by us [26, 27]. The amount of absorbed radiation depends on the concentration [28] and the presence of secreted metabolites, and proteins by bacteria in each supernatant from the urine patient's sample. The proposed spectrometric technique with a classification algorithm makes it possible to perform precise measurements easily.

2 | MATERIALS AND METHODS

Measurements of the absorbance changes resulting in different metabolites/proteins produced during UTI or being produced by uroseptic *E. coli* strains were carried out. The method comprises the absorbance measurements in the spectra range from 600 to 750 nm. By analysis of registered signals, distinguishing urinary tract infections from urinary tract infections that can cause urosepsis is possible.

Clinical *E. coli* strains (241) were obtained from University Clinical Centre in Gdańsk from patient's urine/blood samples. We have collected 86 UTI samples (positive bacterial culture from urine, negative from blood) and 155 urosepsis samples (positive bacterial culture from urine, positive from blood). The collection was done with accordance with bioethical committee agreement No. NKBBN/133/2019.

To investigate if the proposed optical method can discriminate urinary tract infections in biological fluids, we prepared several steps as shown in Figure 1. Mainly: (i)—the first step, collecting urine samples from the patient storing the bacteria on cryopreservation beads, then inoculation of a liquid medium with use of cryopreserved microorganisms; (ii)—after achieving optical density (OD) of liquid culture that allowed for further analysis ($OD_{600} > 0.2$), (iii)—samples were separated into supernatant and pellet; afterwards, (iv)—absorbance measurements of supernatant were conducted; from obtained data, (v)—the validating set and training set were prepared to validate the model. During the preprocessing phase (vi), the noise was removed from the spectra and a specific range for features characterization was chosen. The two most important ones were selected: the area under the graph and the variance of the optical signal, (vii)—finally, classification of patients with UTI and urosepsis upon established criteria.

2.1 | Materials

The minimal medium was prepared according to the following recipe. To 1 L of ultrapure water, 6 g/L disodium hydrogen phosphate (Molecular Biology Grade, Merck, Germany), 3 g/L potassium dihydrogen phosphate (Molecular Biology Grade, Merck, Germany), 0.5 g/L sodium chloride (Molecular Biology Grade, Merck, Germany), and 1 g/L ammonium chloride (Molecular Biology Grade, Merck, Germany) were added and mixed until the components dissolved. The final pH of the solution was set at 7.4 at 25°C. The solution was then autoclaved at 121°C for 15 min, followed by the addition of 2 mL of 1 M magnesium sulfate (Molecular Biology

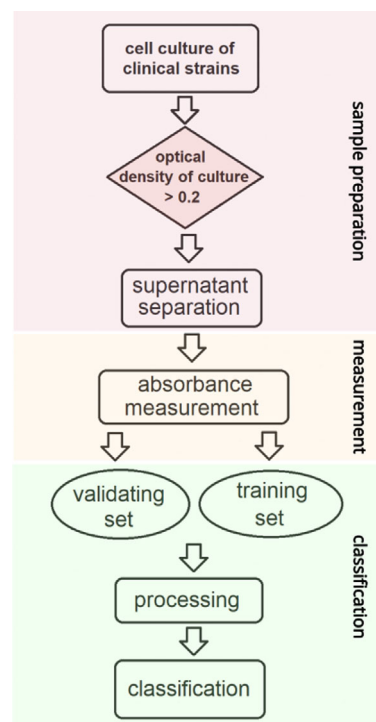


FIGURE 1 Diagram of the proposed method of UTI detection and urosepsis risk assessment.

Grade, Merck, Germany) solution and 20 mL of 20% glycerol solution (Molecular Biology Grade, Merck, Germany). Both solutions were previously subjected to steric filtration through a 0.2 μ m pore diameter filter.

Sterile liquid medium (10 mL) was inoculated with use of rejuvenated bacteria from solid culture of clinical *E. coli* strains. The culture was then conducted for 24 h at 37°C by shaking at 70 rpm. After incubation, two sets of measurements were done: (i)—before and (ii)—after centrifugation to separate the supernatant from the bacteria pellet ($4000 \times g$, 20 min, 25°C). The supernatant was the sample subjected to absorbance measurements. The sample preparation scheme is shown in Figure 2.

2.2 | Normalization

Before the supernatant form—set (ii) was measured to discriminate UTI from urosepsis, and set (i) is measured for normalization parameter.

A 2 mL of liquid before centrifugation (i) was taken. The culture sample was placed in a measurement system. The absorbance value at 600 nm was then read, thus the normalizing parameter OD (optical density at 600 nm) was obtained. Studies have shown that cell density in the sample is proportional to the OD. The OD is usually defined as the absorbance of the sample at 600 nm [29]:

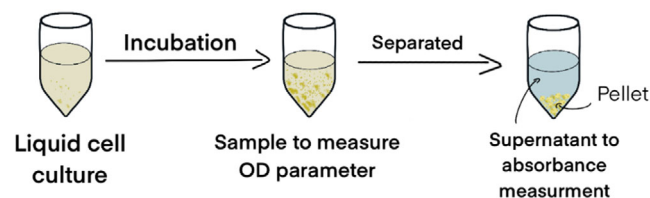


FIGURE 2 Diagram of sample preparation, (i) sample for checking the number of microbial cells in the sample (OD600 measurement), (ii) sample for absorbance measurement for UTI discrimination.

$$\text{OD cell density} = \frac{N}{V}, \quad (1)$$

where N is the number of microbial cells and V is the volume.

OD parameter informs about the number of microbial cells in the sample. The needed number of cells depends on measurement system sensitivity. In our method, we estimated that if the OD parameter is greater than 0.2 it indicates that the biological material from the sample can be used for further preparation. Next, the sample is separated into pellets and supernatant to make a set for UTI and urosepsis discrimination. A sample with supernatant was placed in the measuring device. Measurements were performed on each sample, in the range of 190–840 nm with a wavelength increment equal to 1 nm. The obtained data were normalized using the OD parameter.

2.3 | Measurement system

In the experiment, we used a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). The wavelength range of the spectrophotometer is from 190 to 840 nm, with wavelength accuracy equal to ± 1 nm and bandwidth equal to 1.8 nm. The absorbance measurement accuracy is 3% (at 0.74 Abs at 350 nm).

The device is made of a xenon flashlight as a light source, a monochromator, and silicon CCD photodiodes as detectors. The light emitted by the source splits between the reference channel and the sample channel. In the sample channel, the light passes through the sample and propagates to a monochromator, and then reaches the detector. In the reference channel, the light propagates directly to the monochromator and then is detected by a detector. The obtained data are processed and displayed on the computer.

The absorbance of the supernatant was measured for the entire wavelength range of 190–840 nm, but we decided to use only the region of 600–750 nm for

analysis. Using a narrower range for the proposed method for UTI discrimination analyses will make the method more versatile and allow the use of the different detector.

2.4 | Classification

To understand the different metrics used to evaluate classifiers, it is important to understand the following terms:

1. True Positive (TP): the model correctly identifies a positive sample (e.g., a sample labeled as “UROSEPSIS” is classified as “UROSEPSIS”).
2. True Negative (TN): the model correctly identifies a negative sample (e.g., a sample labeled as “UTI” is classified as “UTI”).
3. False Positive (FP): the model incorrectly identifies a negative sample as positive (e.g., a sample labeled as “UTI” is classified as “UROSEPSIS”).
4. False Negative (FN): the model incorrectly identifies a positive sample as negative (e.g., a sample labeled as “UROSEPSIS” is classified as “UTI”).

Accuracy is a basic and simple measure of the quality of a model. It is calculated by dividing the number of correctly classified samples by the total number of samples. Mathematically, it can be expressed as:

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}. \quad (2)$$

Balanced accuracy is a measure of the model's ability to correctly classify both positive and negative samples.

$$\text{Balanced Accuracy} = \frac{1}{2} \left(\frac{TP}{TP + FP} + \frac{TN}{TN + FN} \right). \quad (3)$$

Receiver operating characteristic area under the curve (ROC AUC) is a metric that measures the ability of a classifier to distinguish between positive and negative classes. The ROC curve can be plotted by using Equations (4) and (5):

$$\text{TPR} = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (4)$$

$$\text{FPR} = \frac{FP}{FP + TN}. \quad (5)$$

F1 Score is a metric that measures the ability of a model to recognize true positives. It is calculated by taking the harmonic mean of precision and recall:

		Predicted Class	
		Positive	Negative
Actual Class	Positive	TP	FN
	Negative	FP	TN

FIGURE 3 Example of the confusion matrix.

$$F1 \text{ score} = \frac{2 \cdot (\text{Precision} \cdot \text{Recall})}{\text{Precision} + \text{Recall}}. \quad (6)$$

Precision is a measure of the proportion of positive samples that are correctly classified and is calculated as the number of true positives divided by the sum of the true positives and FPs

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FP}. \quad (7)$$

Recall, on the other hand, is a measure of the model's ability to detect positive samples, and is calculated as the number of true positives divided by the sum of the true positives and FNs, as shown in the following equation:

$$\text{Recall} = \text{TPR} = \frac{TP}{TP + FN}. \quad (8)$$

A confusion matrix is a graphical representation of the performance of a classifier, showing a summary of the TP, TN, FP, and FN predictions made by the model, as shown in Figure 3.

3 | RESULTS

To discriminate UTI and urosepsis infections, absorption measurements were carried out. For this purpose, urine samples were collected from 241 patients with confirmed *E.coli*-induced UTI (86 isolates) and patients with confirmed *E. coli*-induced urosepsis (155 isolates). Samples were then prepared according to the procedure described in Section 2.1 using the collected urine. The absorbance measurements were performed for each of the obtained samples as shown in Figure 4.

Measurements containing septic material are characterized by lower values of absorbance than measurements from UTI, but changes are minor therefore further analysis is needed. Of the lack of clear correlations, it was decided to use artificial intelligence techniques, specifically machine learning. The main goal was to create

relatively fast-learning models that would nevertheless provide a high level of prediction accuracy. For this reason, the models that were used are categorized as weak learners. The use of the Lazy Predict library made it possible to test as many as 27 such algorithms. This allows a preliminary estimate of which groups of algorithms achieve the best results. To ensure proper verification of the learned models, the dataset was split into two parts, two-thirds being used for training and the remaining one-third being used for testing to validate the model. During the preprocessing phase, the noise was removed from the spectra using a low-pass filter and the used spectral range was from 600 to 750 nm. Relevant features were then selected through feature engineering. From the 59 features determined based on the strength of the optical signal, the two most important ones were selected: The area under the graph and the variance of the optical signal being the most crucial. The best algorithms have been meta-optimized to improve performance. The accuracy results of each of the 27 algorithms in two cases with and without normalization are shown in Figure 5. All the presented results were obtained using the validation dataset.

The following quality metrics were determined for each of the tested algorithms: ROC AUC, F1, confusion matrix, and time taken. The results obtained are presented in Table S1 (for raw data) and Table S2 (for normalized data). The best accuracy for raw data was obtained by the Extra Trees model at 97%, while for normalized data, the highest accuracy was obtained by the K-neighbors algorithm at 95%.

The data obtained and the analysis using classification allowed for the selection of optical culture parameters allowing for virtually zero-one identification of individual strains. As can be seen, the best classification was obtained with use of KNeighborsClassifier classifier reaching around 95% of accuracy. This is a very high result taking into consideration that each clinical strain was different cell culture of a distinct clinical strain with different OD values. We have prepared the cultures in three different batches to ensure the quality of data. The measurements of absorbance were done ungrouped (the samples of UTI and uroseptic strains were mixed, and the proper blanks were also introduced between sample measurements), even though as can be presented in Tables S1, S2 we have achieved very good classification results.

The approach used also allowed for the verification of many classification algorithms, which, based on the collected data, allowed us to distinguish the samples into two groups with high accuracy. Such a result proves that the optical parameters of the cell culture and, consequently, the metabolites, and proteins secreted into the

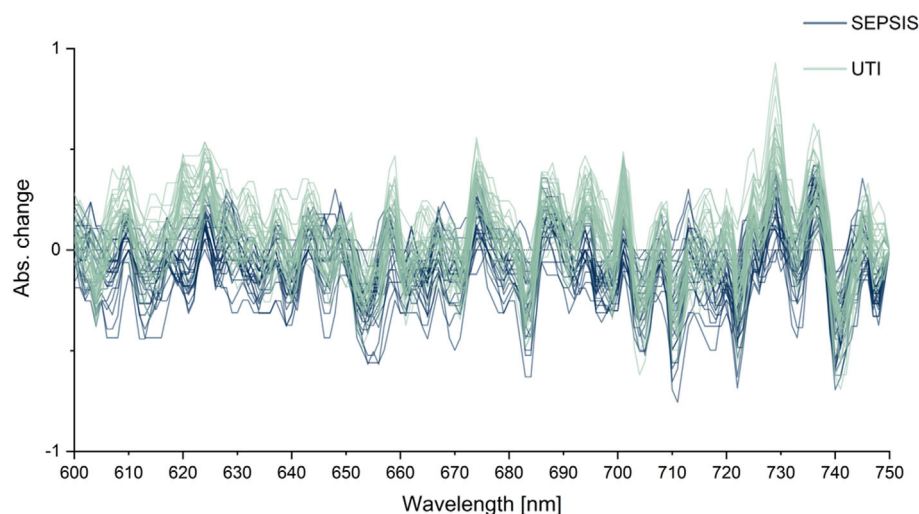


FIGURE 4 Absorbance measurement of supernatant samples from liquid culture (confirmed *E.coli*-induced UTI and *E. coli*-induced urosepsis), pure water was used as a reference, and the liquid medium was used as blank.

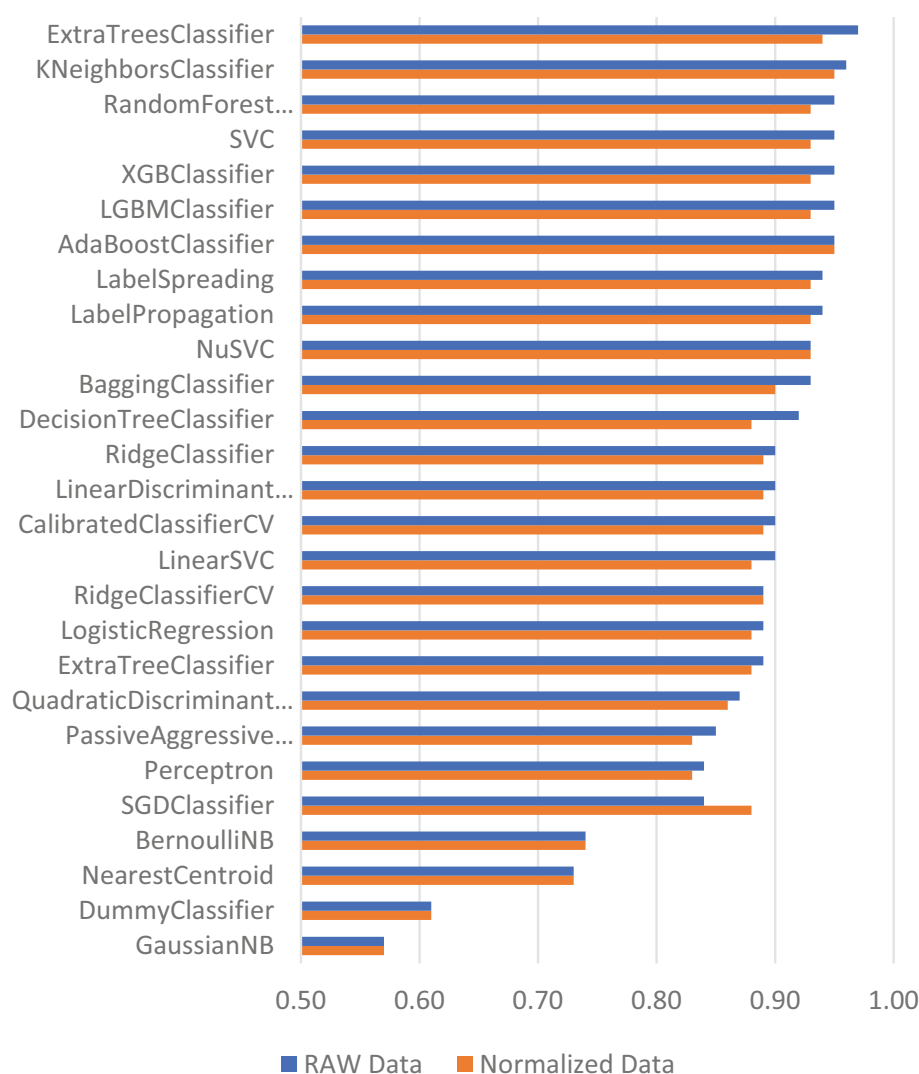


FIGURE 5 Classification accuracy for specific algorithms.

medium by individual strains are unique. As indicated in the literature [30–32], many differences can be observed within the metabolites responsible for the processes of energy production in urosepsis bacteria, as well as the

proteins responsible for healing iron—siderophores. Importantly, our approach of cultivating bacteria on a minimal medium allowed us to verify the optical properties of bacterial cultures, eliminating the risk of

contamination of patients' urine by antibiotics, drugs, or other substances that come, for example, from the food chain.

4 | CONCLUSION

The proposed method can be used in medical laboratories, hospitals, and veterinary facilities. The optical technique can be an alternative to the current method of measuring procalcitonin in the patient's blood [33] and blood and urine culture which takes roughly 24 h. Measurements in the proposed solution take a few seconds, its additional advantages are the simplicity and mobility of the system, versatility, and low cost of the test. The method was validated on samples from 241 patients. Archived classification accuracy depends on the chosen algorithm and achieves an accuracy of up to 97% for raw data, eliminating the need for additional measurements to normalize the dataset.

The sample preparation is the most time-consuming part because it is necessary to grow bacteria in the solution. The time needed for bacteria growth depends on the sensitivity of measuring equipment. Different spectrometers can easily replace a measurement system, in future studies worth to focus on reducing time needed for bacteria incubation by trying more sensitive detectors.

The versatility of the method and measurement equipment used will allow for analysis of other changes in urine associated with changes in the obtained spectrum. The proposed method focuses on measurements in the 60–750 nm range. The equipment used makes it possible to measure a wider spectrum. Appearance of absorption change at other wavelengths can be associated with other bacteria. This means that the method can be developed to perform classification over another or even wider spectral range using the proposed algorithms. It may enable detection of multiple changes in urine simultaneously. To detect changes associated with the appearance of other bacteria, a new predictive model is necessary.

Future studies will attempt to increase the number of measurements when more samples become available. Additionally, the parameters of the algorithms are selected manually, to improve the efficiency of the machine learning algorithms, it is planned to use classical genetic and quantum-inspired algorithms for automatic meta-optimisation. That helps to improve the method.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Paweł Wityk. *Methodology:* Paweł Wityk, Małgorzata Szczerska, Patryk Sokołowski, Kacper

Cierpiak, Beata Krawczyk, Michał J. Markuszewski; *measurements*, Patryk Sokołowski, Paweł Wityk; *measurement data processing and analysis*, Patryk Sokołowski, Kacper Cierpiak, Paweł Wityk, and Małgorzata Szczerska; *writing—original draft preparation*, Paweł Wityk, Patryk Sokołowski, Kacper Cierpiak, Beata Krawczyk, Michał J. Markuszewski. All authors have read and agreed to the published version of the article.

ACKNOWLEDGMENTS

The project is co-financed by the “Excellence Initiative—Research University” of the Medical University of Gdansk through the “Incubator GUMed” project number (PW) 66-00611, by National Science Center (grant no. 2018/29/B/NZ7/02489; MM), by DS programs of Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of Gdańsk Tech, and by the Nds/551425/2022/2022 grant (MSz) under the Ministry of Education and Science program is gratefully acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The author declares that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

ORCID

Paweł Wityk  <https://orcid.org/0000-0001-8612-727X>

Małgorzata Szczerska  <https://orcid.org/0000-0003-4628-6158>

REFERENCES

- [1] T. E. Bjerklund Johansen, M. Cek, K. Naber, L. Stratchounski, M. V. Svendsen, P. Tenke, *Eur. Urol.* **2007**, *51*, 1100.
- [2] M. Guliciuc, A. C. Maier, I. M. Maier, A. Kraft, R. R. Cucuruzac, M. Marinescu, C. Șerban, L. Rebegea, G. B. Constantin, D. Firescu, *Medicina* **2021**, *57*, 872.
- [3] M. Singer, C. S. Deutschman, C. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. der Poll, J. L. Vincent, D. C. Angus, *JAMA* **2016**, *315*, 801.
- [4] C. Liu, S. Suo, L. Luo, X. Chen, C. Ling, S. Cao, *Comput. Math. Methods Med.* **2022**, *2022*, 7870434.
- [5] Z. Liu, Z. Meng, Y. Li, J. Zhao, S. Wu, S. Gou, H. Wu, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **2019**, *27*, 1.
- [6] K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, K. S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F. R. Machado, K. K. Reinhart, K. Rowan, C. W. Seymour, R. S. Watson, T. E. West, F. Marinho, S. I. Hay, R. Lozano, A. D. Lopez, D. C. Angus, C. J. L. Murray, M. Naghavi, *Lancet* **2020**, *395*, 200.
- [7] N. M. Dreger, S. Degener, P. Ahmad-Nejad, G. Wöbker, S. Roth, *Dtsch. Arztebl. Int.* **2015**, *112*, 837.
- [8] E. Ott, S. Saathoff, K. Graf, F. Schwab, I. F. Chaberny, *Dtsch. Arztebl. Int.* **2013**, *110*, 533.

- [9] D. Jarczak, S. Kluge, A. Nierhaus, *Front. Med.* **2021**, *8*, 609.
- [10] M. Tocut, I. Zohar, O. Schwartz, O. Yossepowitch, Y. Maor, *BMC Infect. Dis.* **2022**, *22*, 1.
- [11] S. D. Smith, M. A. Wheeler, M. I. Lorber, R. M. Weiss, *Kidney Int.* **2000**, *58*, 829.
- [12] R. S. Gabarin, M. Li, P. A. Zimmer, J. C. Marshall, Y. Li, H. Zhang, *J. Innate. Immun.* **2021**, *13*, 323.
- [13] J. Liang, W. Wu, X. Wang, W. Wu, S. Chen, M. Jiang, *J. Healthc. Eng.* **2022**, *2022*, 1.
- [14] P. Verma, A. Singh, R. Kushwaha, G. Yadav, S. P. Verma, U. S. Singh, H. D. Reddy, and A. Agarwal, in *Early and Effective Diagnosis of Sepsis Using Flow Cytometry*, Thieme Medical and Scientific Publishers Pvt. Ltd., Noida **2022**.
- [15] Y. Wang, J. Zhao, Y. Yao, D. Zhao, S. Liu, *Biomed. Res Int.* **2021**, *2021*, 5516940.
- [16] C. Vázquez-Carballo, M. Guerrero-Hue, C. García-Caballero, S. Rayego-Mateos, L. Opazo-Ríos, J. L. Morgado-Pascual, C. Herencia-Bellido, M. Vallejo-Mudarra, I. Cortegano, M. L. Gaspar, B. de Andrés, J. Egido, J. A. Moreno, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 816.
- [17] A. Mahmoodpoor, S. Paknezhad, K. Shadvar, H. Hamishehkar, A. A. Movassaghpour, S. Sanaie, A. A. Ghamari, H. Soleimanpour, *Anesth. Pain. Med.* **2018**, *8*, 83128.
- [18] L. E. Lehmann, K. P. Hunfeld, T. Emrich, G. Haberhausen, H. Wissing, A. Hoeft, F. Stüber, *Med. Microbiol. Immunol.* **2008**, *197*, 313.
- [19] R. L. Sautter, A. R. Bills, D. L. Lang, G. Ruschell, B. J. Heiter, P. P. Bourbeau, *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 1245.
- [20] J. A. Kellogg, F. L. Ferrentino, M. H. Goodstein, M. Liss, J. Shapiro, S. L. Bankert, D. A. Bs, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1997**, *16*, 381.
- [21] G. P. Castelli, C. Pognani, M. Meisner, A. Stuardi, D. Bellomi, L. Sgarbi, *Crit. Care* **2004**, *8*, R234.
- [22] Thermo Scientific™. B-R-A-H-M-S™ PCT-Q, product website. <https://www.thermofisher.com/infectious-diseases/wo/en/procalcitonin/brhms-pct-q.html> accessed 22.02.2023.
- [23] M. Meisner, *Ann Lab Med* **2014**, *34*, 263.
- [24] X. Luo, X. Yang, J. Li, G. Zou, Y. Lin, G. Qing, R. Yang, W. Yao, X. Ye, *Medicine* **2018**, *97*, e11078.
- [25] L. Jiang, S. H. Lin, J. Wang, C. K. Chu, *Medicine* **2021**, *100*, E26555.
- [26] M. Szczerska, M. Kosowska, R. Viter, P. Wityk, *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202200213.
- [27] M. Szczerska, P. Wityk, P. Listewnik, *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202200186.
- [28] M. Marzejon, M. Kosowska, D. Majchrowicz, B. Bułło-Piontecka, M. Wąsowicz, M. Jędrzejewska-Szczerska, *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201800273.
- [29] M. Domańska, K. Hamal, B. Jasionowski, J. Łomotowski, *Pol. J. Environ. Stud.* **2019**, *28*, 4503.
- [30] J. Horváth, B. Wullt, K. G. Naber, B. Köves, *GMS Infect. Dis.* **2020**, *8*, Doc24.
- [31] B. Khasheii, S. Anvari, A. Jamalli, *Iran. J. Microbiol.* **2016**, *8*, 359.
- [32] Y. Wang, Y. Jin, X. Ji, M. Huang, B. Xie, *Infect. Drug Resist.* **2022**, *15*, 7339.
- [33] M. Sinha, S. Desai, S. Mantri, A. Kulkarni, *Indian J. Anaesth.* **2011**, *55*, 266.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: P. Wityk, P. Sokołowski, M. Szczerska, K. Cierpiak, B. Krawczyk, M. J. Markuszewski, *J. Biophotonics* **2023**, *16*(9), e202300095. <https://doi.org/10.1002/jbio.202300095>

RESEARCH ARTICLE

Optical method supported by machine learning for dynamics of C-reactive protein concentrations changes detection in biological matrix samples

Patryk Sokołowski¹ | Kacper Cierpiak¹ | Małgorzata Szczerska¹  |
Maciej Wróbel¹  | Aneta Łucziewicz² | Sylwia Fudala-Książek³ |
Paweł Wityk^{4,5} 

¹Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

²Department of Environmental Engineering Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

³Department of Sanitary Engineering, Faculty of Civil and Environmental Engineering, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

⁴Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

⁵Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

Correspondence

Paweł Wityk, Medical University of Gdańsk, 80-210 Gdańsk, Poland.

Email: pawel.wityk@gumed.edu.pl

Funding information

Politechnika Gdańska, Grant/Award Number: DS; Ministerstwo Edukacji i Nauki, Grant/Award Number: NdS/551425/2022/2022

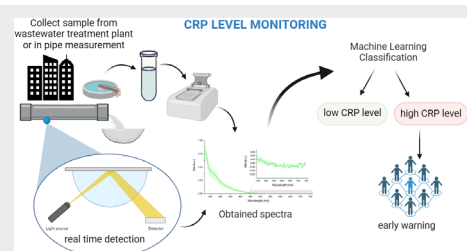
[Correction added on 19 September 2025, after first online publication: The copyright line was changed.]

Abstract

In this article we present the novel spectroscopy method supported with machine learning for real-time detection of infectious agents in wastewater. In the case of infectious diseases, wastewater monitoring can be used to detect the presence of inflammation biomarkers, such as the proposed C-reactive protein, for monitoring inflammatory conditions and mass screening during epidemics for early detection in communities of concern, such as hospitals, schools, and so on. The proposed spectroscopy method supported with machine learning for real-time detection of infectious agents will eliminate the need for time-consuming processes, which contribute to reducing costs. The spectra in range 220–750 nm were used for the study. We achieve accuracy of our prediction model up to 68% with using only absorption spectrophotometer and machine learning. The use of such a set makes the method universal, due to the possibility of using many different detectors.

KEYWORDS

biological matrix, biomarker, machine learning, optical method, spectroscopy, wastewater



Abbreviations: BOD5, 5-day biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; CRP, C-reactive protein; ML, machine learning; P.E., population equivalent; WWS, wastewater sample.

1 | INTRODUCTION

C-reactive protein (CRP), an acute-phase reactant synthesized in the liver, has emerged as a pivotal biomarker in the assessment of inflammatory processes. Its quantification has been integral in clinical settings for diagnosing and monitoring various inflammatory conditions, with applications extending beyond individual patient care to broader public health contexts. This scientific introduction outlines the fundamental importance of CRP measurements, emphasizing the potential for mass screening during epidemics as a proactive strategy for early detection and intervention [1].

CRP serves as a sensitive and dynamic marker of systemic inflammation. Elevated CRP levels are indicative of a broad spectrum of pathological conditions, including infectious diseases, autoimmune disorders, and cardiovascular events. Its rapid and robust response to inflammatory stimuli positions CRP as a valuable tool for assessing the presence and severity of inflammatory processes [1, 2]. In the context of epidemic outbreaks, early detection of infections is paramount for effective public health management. CRP measurements offer a nonspecific yet highly sensitive indication of the body's response to infection, enabling timely identification of individuals with potential infectious diseases. The ability to monitor CRP levels at a population scale facilitates proactive health surveillance, aiding in the implementation of targeted interventions and resource allocation [3].

Epidemics, characterized by the rapid spread of infectious agents, demand innovative and scalable screening strategies for timely containment. Mass screening for CRP presents an opportunity to identify individuals with heightened inflammatory responses, serving as a proxy for early-stage infections. Integrating CRP measurements into large-scale screening programs can contribute to the identification of asymptomatic or presymptomatic carriers, thereby interrupting transmission chains and mitigating the impact of infectious diseases [4]. In the case of infectious diseases, wastewater monitoring can be used to detect the presence of the virus in communities of concern, such as hospitals, eldercare homes, kindergartens, schools, and so on. This information can help public health authorities make informed decisions regarding preventive and control measures, such as implementing targeted interventions and isolation protocols.

Implementing CRP-based mass screening during epidemics provides a data-driven approach for allocating resources efficiently. By stratifying individuals based on their CRP levels, public health authorities can prioritize testing, treatment, and quarantine measures for those at higher risk of infection or complications. This targeted approach optimizes the use of limited resources and enhances the overall effectiveness of public health interventions [5].

Recent technological advancements, including innovative optical methods supported by machine learning, have facilitated the development of rapid and scalable CRP measurement techniques. Integrating these technologies into mass screening programs enhances the feasibility of large-scale testing, making it a practical and cost-effective strategy for epidemic preparedness and response [6]. In conclusion, the incorporation of CRP measurements into mass screening programs represents a paradigm shift in epidemic management, offering a proactive and data-driven approach to identify, isolate, and treat individuals at risk [7]. The significance of CRP as an inflammatory marker, coupled with technological advancements, underscores the potential of CRP-based mass screening as a crucial component of contemporary public health strategies during epidemics.

CRP is considered a biomarker of tissue damage, infection, or inflammation in the human body [8]. It is one of the most extensively studied markers commonly used to diagnose and monitor infections, especially in the emergency room or as a point-of-care test for differentiating bacterial from nonbacterial infections [9]. However, detecting CRP in wastewater might not be a common practice. Monitoring the presence level of CRP in wastewater might be used to track the spread of diseases or identify areas with increased morbidity. Based on monitoring system in wastewater treatment plants and in the sewage pipe inside the building the wastewater-based epidemiology can be applied [10, 11]. It is an emerging approach for community epidemiology surveillance. CRP level analysis may allow faster epidemic detection or assist in tracking the effectiveness of health interventions within a population. Thus, wastewater monitoring provides a complementary approach to traditional clinical diagnostic methods and has been recognized by the World Health Organization (WHO) as a useful tool to effectively combat epidemics. The development of new biosensors for online, real-time detection of infectious agents will eliminate the need for time-consuming processes, such as sample preparation, RNA extraction, or polymerase chain reaction (PCR). The proposed optical method is based on absorption measurement, allowing the determination of the changes in radiation intensity. The amount of absorbed radiation depends on the concentration, also CRP. The use of spectroscopic methods creates a very versatile method with easy change of source and detector. The advantage of this solution is the ability to install measuring device in wastewater system, but also possibility to use portable spectrophotometers in the field. Additionally, in this study, the measurement signals obtained from the biosensor were used to generate datasets utilized in machine learning models. This predictive capability can be instrumental in providing early warnings and identifying potential infection outbreaks, allowing for timely intervention and

control measures to limit the spread of viral particles. This study also underlines the need for validation and rigorous testing to ensure their reliability and accuracy, which is crucial for the successful implementation of biosensors in disease surveillance and outbreak prediction.

2 | EXPERIMENTAL SECTION

In this study, wastewater sample (WWS) was used as the biological matrix. WWS contains a mix of organic and inorganic components, particles. Biological material in WWS was derived from bodily fluids and environment. Optical methods were used for the study. The absorbance measurements [12, 13] offer a monitoring of composition change present in the WWS. To detect changes of CRP concentration level in wastewater sample UV-Vis spectroscopy was used. The obtained absorbance measurements from WWS are compared with the support of machine learning. Figure 1 shows a diagram of the experiment.

2.1 | Material

WWS from sewage plant “Dębogórze” located in the Pomerania region (northern Poland) were collected. The treatment plant load is estimated at 440.000 P.E. For CRP study, samples collected for 3 months, during the period of August–October 2023, were used. During the mentioned period, a total of 14 WWS were taken from different days.

Investigated WWS are defined based on physical, chemical, and biological characteristics [14]. The parameters that the sewage plant monitors were determined by chemical oxygen demand (COD), 5-day biochemical oxygen demand (BOD5), suspended solids, alkalinity, temperature, pH, electrical conductivity, nitrogen, and phosphate. Table 1 presents the average value of parameter for WWS.

To investigate if the proposed optical method can detect changes in level of CRP, we prepared several solutions by adding CRP (90%–95% purity, Merck, Germany) to WWS at known concentration. From each WWS collected, another four samples were created with CRP concentrations ranging from 10^{-4} to 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$. Usually, CRP concentration in urine of healthy patients is 100 $\mu\text{g/mL}$ [15]. Taking dilution into account in WWS we can work with the lower

range of CRP concentration to monitor the elevation of its level. Since the composition of WWS is constantly changing, there is a need to train an algorithm to distinguish whether an increase in chemical compounds will interfere with the detection of an increase in CRP levels. Thus, additional mixes of different WWS were created to ensure as much diversity as possible.

2.2 | Experimental methods

WWS before investigation was characterized by Raman spectroscopy. For the measurements, the WWS were dried. Raman spectra were recorded using an in-house made Raman spectroscopy system which consists of: spectrograph with about 8 cm^{-1} resolution (HT Raman, EmVision llc, FL, USA), a TE-cooled CCD camera (iDus 420 BR-DD, Andor, UK) with 830 nm excitation wavelength laser with output power of 500 mW (Innovative Photonics Solutions, NJ, USA), and a fiber-optics contact probe with large working area of about 0.5 mm^2 spot size (EmVision llc, FL, USA). Raman spectra were acquired from samples of sewage which were dried in standard conditions for about 30 min on clean polished aluminum substrates, and measured with a probe at its focal point, near-contact. The

TABLE 1 Wastewater sample characteristics.

Parameters	Value	Unit
COD	1268.4	mgO_2/dm^3
BOD5	614.2	mgO_2/dm^3
Suspension solids	561.7	mg/dm^3
Alkalinity	9.8	mg/dm^3
Kjeldahl nitrogen	97.2	$\text{mg N}/\text{dm}^3$
Ammonium nitrogen	69.8	$\text{mg N}/\text{dm}^3$
Organic nitrogen	27.4	$\text{mg N}/\text{dm}^3$
Total nitrogen	97.2	$\text{mg N}/\text{dm}^3$
Orthophosphate	5.9	$\text{mg P}/\text{dm}^3$
Total phosphate	12.3	$\text{mg P}/\text{dm}^3$
Electrical conductivity	936	$\mu\text{S}/\text{cm}$
Temperature	16.4	$^{\circ}\text{C}$
pH	7.8	

Abbreviations: BOD5, 5-day biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand.

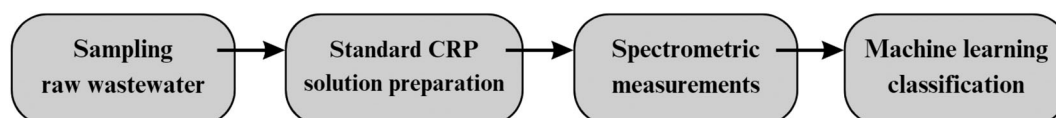


FIGURE 1 Experiment diagram with the four main steps of the method.

detector was cooled to -60°C , and the measurement time was set to 1 s with 20 averages, with the optical power at the probe output of about 50 mW as to not damage or burn the sample. The signal-to-noise ratio was on average equal 20, which means that the signal is of acceptable quality, although it can be further improved.

For further study, the absorption spectroscopy was used. Spectra were recorded for WWS and with different concentrations of CRP. To register signals, a NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) spectrophotometer with a wavelength range of 220–750 nm, with accuracy of 1 nm was used. The device wavelength resolution is 3 nm and measured absorbance accuracy of 2%. A sample volume of 2 μL is used for the measurement.

The UV–Vis spectrum changes with WWS composition, thus it can be used as an indicator to monitor dynamic changes in composition. The spectrum of WWS consists of high absorption at the beginning of the measurement range. However, the entire spectrum is used to monitor the dynamics of CRP concentration changes. Data at wavelengths above 450 nm, despite the low intensity of the signal can be significant. By using machine learning (ML) it is possible to search for correlations between spectrum and CRP changes.

2.3 | Classification

With the support of ML obtained spectra were put into classification. The aim was to divide the samples into two groups. The first group with samples having CRP concentrations below 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ and the second group contained samples with CRP concentration above 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. This division allows to monitor CRP concentration in WWS.

Classification is a fundamental concept in machine learning that involves assigning data points to predefined categories or classes based on their characteristics. This process is analogous to sorting objects into different boxes based on their attributes. Classification algorithms learn from labeled data, which means that the data points in the training set are already associated with their respective categories. As the algorithm analyzes the training data, it identifies patterns and relationships between the data points and their corresponding classes. These patterns are then used to classify new, unlabeled data points by assigning them to the most likely class based on their characteristics [16–18].

The data preparation phase involved filtering the data and identifying signal peaks. Feature engineering and selection techniques were applied to extract relevant features for ML algorithms. With this process seven key features were identified and summarized in Table 2. To evaluate the significance of each feature, the importance

TABLE 2 Summary of the features used in the model, along with their descriptions and their relative importance.

Features	Description	Feature importance
F1	Peaks prominence standard deviation	0.168
F2	Power density standard deviation value over the full measured range	0.157
F3	Median absolute deviation (MAD) of power density over the range between the first and last peak	0.151
F4	Power density variance value over the full measured range	0.150
F5	Geometric mean of the power density over the range between the first and last peak	0.133
F6	Peaks width standard deviation	0.121
F7	Peaks width variance	0.120

permutation method was employed. This method assesses individual feature importance by measuring the change in model performance when a feature's values are randomly permuted. Critical features should significantly impact performance when permuted, while less important features should minimally affect performance [19, 20].

Three of the selected features F1, F6, and F7 need a more detailed explanation, as they are directly related to the peaks present in spectra and, more specifically, to the metrics that describe these peaks. Feature F1 uses a measure describing how much the peak stands out from its surroundings (Peaks Prominence), while features F6 and F7 are based on the width of the peaks (Peaks Width). A graphical interpretation of the basic metrics used to define peaks is shown in Figure 2.

Our research utilized a binary classification approach hence the division of the dataset into two classes: one representing samples with CRP concentrations below 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ and the other including samples with CRP concentrations exceeding 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. This perfectly balanced dataset contains 540 samples in each group, amounting to a total of 1080 samples. However, excessive emphasis on training data can lead to overfitting, compromising the model's performance. To address this issue, we perform a training-validation split, allocating 723 samples to the training set and 357 samples to the validation set. This approach allowed us to effectively evaluate the model's performance as it prepares for its real-world application, enabling us to identify potential overfitting and make adjustments to ensure that the model generalizes well to new data. This process is crucial for developing robust and accurate ML models [21].

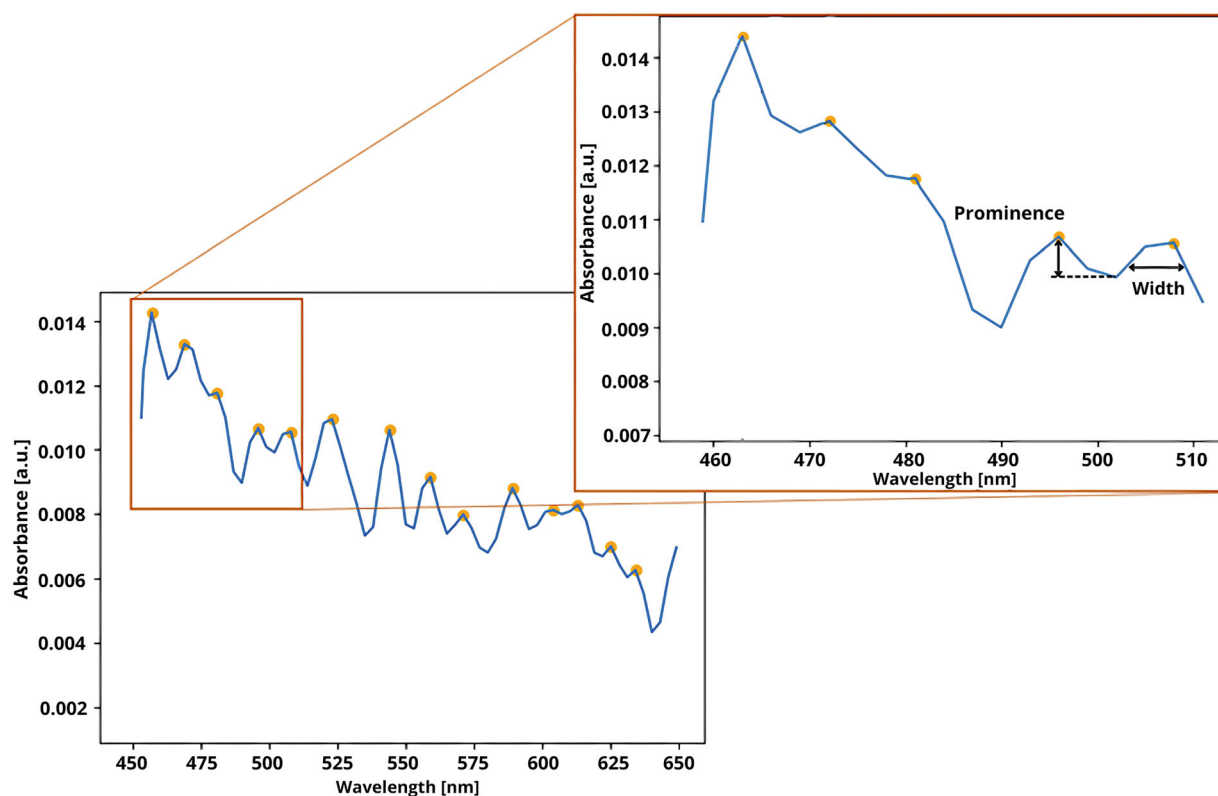


FIGURE 2 Graphical explanation of the prominence and width metrics used to describe the peaks.

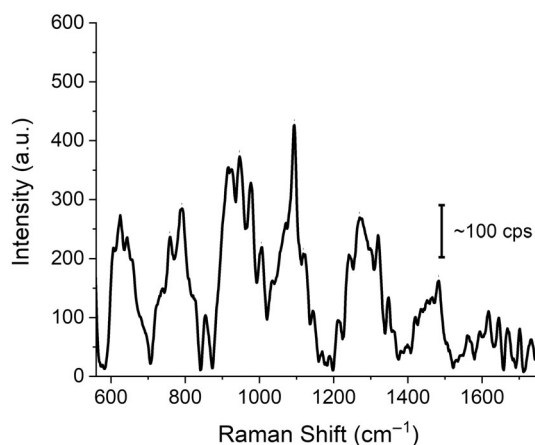


FIGURE 3 Raman spectra of dried wastewater sample.

3 | RESULTS

3.1 | Spectrometric characterization

Raman spectrum presented in Figure 3 shows the data for a dried sample of WWS. The signal is not very strong with entirety of the spectrum signal encompassing about 500 counts per seconds (cps), with the bar in Figure 3 showing about 100 cps, yet after normalization,

background removal and smoothing a viable spectrum is achieved. Specific identification of the origin of the peaks is difficult because the spectrum is a mixture of largely organic matter and inorganic sediments from WWS. The most prominent peaks with their possible assignments are at about 1482 cm^{-1} C–H rocking, 1319 cm^{-1} –OH, 1269 cm^{-1} amide III, 1094 cm^{-1} C–C stretch, 787 cm^{-1} C–H bending, 621 cm^{-1} ring deformation, and broadband in regions about $1400\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$ CH_2 and CH_3 , $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, and $900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$.

The Raman spectra were shown to present additional information available by the means of molecular spectroscopy method, which not only shows its similarity to other spectra in the literature, but also proves lack of additional impurities and contamination of the sample which would cause gross errors in other methods which the article focuses on extensively. Also there are not many raw sewage Raman spectra provided in the literature, thus we find it valuable to present these results in the scope of our further research.

3.2 | Spectrometric measurements

The proposed CRP monitoring method in WWS is based on absorbance measurement. Thus, absorbance

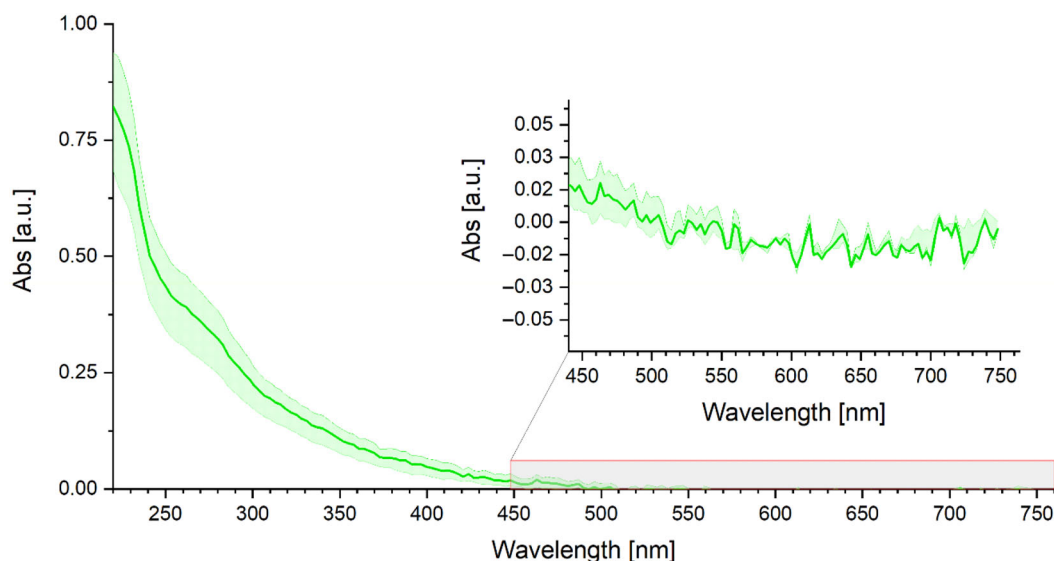


FIGURE 4 Absorbance characteristics of wastewater sample.

characterization was carried out. The UV–Vis spectroscopy in range 220–750 nm was used for measurement as it was for the entire study. Figure 4 shows obtained absorbance characteristics of WWS. As reference value—blank—the ultrapure water was used. The blank value was subtracted from obtained WWS spectra. The bold line indicates the arithmetic mean value. The upper and lower values are reported as shaded areas.

The observed absorbance characteristics of WWS, as illustrated in Figure 4, highlight the dynamic nature of the UV–Vis spectrum in response to changes in WWS content. The high absorption at the beginning of the spectrum suggests the presence of substances with strong absorbance in the UV range (organic matter, e.g., proteins). However, it was observed that using the entire range of the spectroscope does not affect the obtained accuracy. By cutting out the UV range, the method will be quicker and more affordable (cheaper detectors). In the measured range, many compounds found in WWS affect the spectrum. This variability in absorbance serves as a promising indicator for monitoring changes in the composition of WWS. The successful detection of CRP in WWS validates the efficacy of the proposed optical method with the cutoff value of 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. The ML algorithm, trained on a diverse dataset that includes variations in WWS composition, demonstrates the adaptability of the system to the dynamic nature of environmental samples. This integrated approach holds great promise for real-time monitoring and early detection of elevated CRP concentrations in WWS during epidemic scenarios, contributing to proactive public health management. Further studies will explore the scalability and applicability of this method in diverse environmental settings.

TABLE 3 Accuracy score of machine learning models.

Model	Accuracy
ExtraTrees	68.1%
RandomForest	66.7%
XGBoost	65.6%
DecisionTree	61.9%
KNeighbors	60.5%

TABLE 4 Summary of ExtraTrees Classifier algorithm performance using confusion matrix.

		Predicted class	
		Negative (CRP $\leq 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$)	Positive (CRP $> 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$)
Actual class	Negative	118	61
	Positive	53	125

3.3 | Machine learning analysis of wastewater sample spectra

Subsequently, we trained five models based on the ExtraTrees, RandomForest, XGBoost, DecisionTree, and KNeighbors algorithms. These five algorithms were chosen for their distinct strengths and weaknesses. This diversity enables a comprehensively nuanced assessment of different learning approaches and a deeper understanding of dataset characteristics. It is noteworthy that these algorithms are widely used and well established in the field of machine learning, especially for classification tasks. Their popularity provides a wealth of knowledge

TABLE 5 The characteristic of representative method for detection of C-reactive protein (CRP).

Name	Accuracy	Processing time	Limit of detection	Sample	DOI
Proposed solution	68.1%	Near-real time	0.1 µg/L	Wastewater	N/A
Fiber sensor	-	<10 min	5.65 µg/L	CRP standardized solution	[7]
Chemiluminescence in microfluid	-	30 min	15.5 µg/L	Clinical samples	[23]
Photonics crystal	-	5 min	12.24 ng/L	Human serum	[22]
Surface plasmon resonance		10 min	9 µg/L	Human serum	[28]
Enzyme-linked immunosorbent assay	-	Near-real time	1 µg/L	PBS and serum	[26]
Voltametric	-	-	0.5 µg/L	Human serum	[25]
Detection base on electrocardiograms	69.9%	-	5 mg/L	-	[24]

and resources available for implementing, fine-tuning, and evaluating models. The resulting prediction accuracy for each model is presented in Table 3. Interestingly, each of the selected algorithms exceeded the 60% accuracy, where the best result was achieved by the model based on the ExtraTrees algorithm achieving a score of over 68% accuracy.

To further evaluate the performance of the ExtraTrees model, a confusion matrix was prepared and is shown in Table 4. To simplify the table descriptions, it was assumed that samples containing a CRP concentration less than or equal to 10^{-4} µg/mL would be labeled as negative, while samples containing a concentration greater than 10^{-4} µg/mL would be labeled as positive. Out of 179 negative samples, the model correctly identified 118 as negative (True Negatives) and misclassified 61 as positive (False Positives). For the 178 positive samples, 125 were correctly classified as positive (True Positives) and 53 were misclassified as negative (False Negatives). These results indicate that the ExtraTrees model exhibits reasonable accuracy in classifying CRP levels into the two categories.

4 | DISCUSSION

Identifying the CRP level stands as a crucial part of diagnostics. Among others, the optical methods but not only are successfully applied. Table 5 shows the comparison of methods for detection of CRP. Of the presented methods, the solution using photonic crystal has the lowest detection concentration of 12.24 ng/L [22]. The method, which uses a fiber optic sensor, features detection from a concentration of 5.65 µg/L [7]. The advantage of this method is the small size of the sensor. The method using microfluids has reach detection 15.5 µg/L requires a very small sample volume [23]. The disadvantage of this method in particular applications may be the long processing time of 30 minutes. It was an interesting idea to measure CRP from analysis of electrocardiograms with machine learning obtained the

accuracy of CRP level prediction of 69.9% [24]. A method with a very good level of detection 0.5 and 1 µg/L are voltametric [25] and most recent clinical method using the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [26]. The assays usually require to use human plasma derived from blood of patient and are based on antibody/CRP interaction. Some of the assays like ELISA can be used to determine the concentration of CRP in different bioliquids like urine or wastewater, due to the nature of the diagnostic test [27]. The advantage of ELISA method is enabling measurements in almost real time. Nevertheless, the methods for CRP determination in clinical practice are more or less the same for past decades.

The table shows that a challenge of CRP detection system is to get the limit of detection as low as possible and to get the measurement time as short as possible. The main advantage of the proposed method is to use an optical system, that allows to monitoring dynamic of CRP level changes in near-real time. Additionally, the method enables detection in collected sample but also allows to install measurement system with minimal modification to existing sewer systems. This means that the device can monitor CRP in a way that does not require sampling by man. The proposed measurement range allows to use unexpensive optoelectronic elements, though the system can be installed in many nodes of the sewer network. This will enable dynamic of changes of increased morbidity in different parts of the city or building for early warning.

5 | CONCLUSION

Monitoring the CRP presence in WWS has the potential to track disease spread and identify regions with heightened morbidity. Analyzing CRP levels could expedite epidemic detection and aid in evaluating the efficacy of health interventions across populations. The proposed optical method with ML support can be widely used in places such as schools, hospitals, and office buildings.

The development of new biosensors for online, real-time detection of infectious agents will eliminate the need for time-consuming processes, such as sample preparation, RNA extraction, or PCR and at the same time, it will reduce monitoring costs. The advantage of the solution is processing time and versatility, the measurement equipment can also be used for other spectrophotometric measurements.

The chemical composition of WWS is constantly changing. These are significant changes as can be observed in the presented characteristics for WWS. This affects the work of ML algorithms. Despite of that we achieve accuracy of our prediction model up to 68% with using only simple spectrophotometer and machine learning. No additional markers or sensor modifications were used for the wastewater matrix.

Monitoring WWS over a longer period could help to better teach the algorithms to detect dynamics changes of CRP concentrations with higher accuracy. It could help the method to become more resistant to erroneous detection caused by an increase above the standard of another biological matter present in WWS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Paweł Wityk and Małgorzata Szczerska. **Methodology:** Patryk Sokołowski and Małgorzata Szczerska. **Sample collection:** Aneta Łuczkiewicz and Sylwia Fudala-Książek. **Sample preparation:** Patryk Sokołowski and Paweł Wityk. **Investigation and writing—original draft preparation:** Patryk Sokołowski, Paweł Wityk, and Kacper Cierpiak. **Raman spectroscopy measurement:** Maciej Wróbel. **Spectroscopy measurement:** Patryk Sokołowski. **Measurement data processing and analysis:** Kacper Cierpiak. **Writing—review and editing:** Paweł Wityk and Małgorzata Szczerska. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The project is co-financed by DS programs of Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of Gdańsk Tech, and by the NdS/551425/2022/2022 grant under the Ministry of Education and Science program is gratefully acknowledged. The authors would like to acknowledge Ying Hsueh Chen for helping during the spectroscopic measurements.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Małgorzata Szczerska  <https://orcid.org/0000-0003-4628-6158>

Maciej Wróbel  <https://orcid.org/0000-0002-4521-0760>

Paweł Wityk  <https://orcid.org/0000-0001-8612-727X>

REFERENCES

- [1] R. Ramamoorthy, V. Nallasamy, R. Reddy, N. Esther, Y. Maruthappan, *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2012**, *4*, 422.
- [2] N. A. Martínez-González, E. Keizer, A. Plate, S. Coenen, F. Valeri, J. Y. J. Verbakel, T. Rosemann, S. Neuner-Jehle, O. Senn, *Antibiotics* **2020**, *9*, 1.
- [3] P. Barroso, D. Relimpio, J. A. Zearra, J. J. Cerón, P. Palencia, B. Cardoso, E. Ferreras, M. Escobar, G. Cáceres, J. R. López-Olvera, C. Gortázar, *One Health* **2023**, *16*, 100479.
- [4] R. Haneef, S. Kab, R. Hrzic, S. Fuentes, S. Fosse-Edorh, E. Cosson, A. Gallay, *Arch. Public Health* **2021**, *79*, 1.
- [5] J. Cooke, C. Llor, R. Hopstaken, M. Dryden, C. Butler, *BMJ Open Respir. Res.* **2020**, *7*, e000624.
- [6] J. Qin, M. Li, Y. Liang, *Inf. Fusion* **2022**, *80*, 121.
- [7] M. Szczerska, M. Kosowska, R. Viter, P. Wityk, *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202200213.
- [8] M. D. Sonawane, S. B. Nimse, *Anal. Methods* **2017**, *9*, 3400.
- [9] J. W. L. Cals, M. H. Ebell, *Br. J. General Pract.* **2018**, *68*, 112.
- [10] C. Oh, A. Zhou, K. O'Brien, Y. Jamal, H. Wennerdahl, A. R. Schmidt, J. L. Shisler, A. Jutla, L. Keefer, W. M. Brown, *Sci. Total Environ.* **2022**, *852*, 158448.
- [11] T. Prado, T. M. Fumian, C. F. Mannarino, P. C. Resende, F. C. Motta, A. L. F. Eppinghaus, V. H. Chagas Do Vale, R. M. S. Braz, J. D. S. R. De Andrade, A. G. Maranhão, M. P. Miagostovich, *Water Res.* **2021**, *191*, 116810.
- [12] P. Wityk, P. Sokołowski, M. Szczerska, K. Cierpiak, B. Krawczyk, M. J. Markuszewski, *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202300095.
- [13] M. Szczerska, P. Wityk, P. Listewnik, *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202200172.
- [14] R. Rashid, I. Shafiq, P. Akhter, M. J. Iqbal, M. Hussain, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 9050.
- [15] Y. C. Chuang, V. Tyagi, R. T. Liu, M. B. Chancellor, P. Tyagi, *Urol. Sci.* **2010**, *21*, 132.
- [16] M. Kruczkowski, A. Drabik-Kruczkowska, A. Marciniak, M. Tarczewska, M. Kosowska, M. Szczerska, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1.
- [17] M. A. Moreno-Ibarra, Y. Villuendas-Rey, M. D. Lytras, C. Yáñez-Márquez, J. C. Salgado-Ramírez, *Mathematics* **2021**, *9*, 1817.
- [18] S. A. Hicks, I. Strümke, V. Thambawita, M. Hammou, M. A. Riegler, P. Halvorsen, S. Parasa, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1.
- [19] L. Breiman, *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5.
- [20] A. Fisher, C. Rudin, F. Dominici, *J. Mach. Learn. Res.* **2018**, *20*, 1.
- [21] A. K. P. Anil, U. K. Singh, *J. Syst. Eng. Inf. Technol. (JOSEIT)* **2023**, *2*, 77.
- [22] T. Endo, H. Kajita, Y. Kawaguchi, T. Kosaka, T. Himi, *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 831.
- [23] W. B. Lee, Y. H. Chen, H. I. Lin, S. C. Shiesh, G. Lee, *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *157*, 710.
- [24] J. Jiang, H. Deng, H. Liao, X. Fang, X. Zhan, S. Wu, Y. Xue, *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 864747.

- [25] A. Kowalczyk, J. P. Sęk, A. Kasprzak, M. Poplawska, I. P. Grudzinski, A. M. Nowicka, *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 232.
- [26] N. Christodoulides, M. Tran, P. N. Floriano, M. Rodriguez, A. Goodey, M. Ali, D. Neikirk, J. T. McDevitt, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3030.
- [27] W. L. Roberts, *Circulation* **2004**, *110*, e572. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148986.52696.07>
- [28] A. Aray, F. Chiavaioli, M. Arjmand, C. Trono, S. Tombelli, A. Giannetti, N. Cennamo, M. Soltanolkotabi, L. Zeni, F. Baldini, *J. Biophotonics* **2016**, *9*, 1077.

How to cite this article: P. Sokołowski, K. Cierpiak, M. Szczerska, M. Wróbel, A. Łuczkiwicz, S. Fudala-Książek, P. Wityk, *J. Biophotonics* **2025**, *18*(12), e202300523. <https://doi.org/10.1002/jbio.202300523>

Effect of temperature change on the refractive index of an egg white and yolk: a preliminary study

Patryk Sokołowski*

*Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics,
Gdańsk Tech, 11/12 Narutowicza Street, 80-233 Gdańsk, Poland*

Received April 01, 2022; accepted June 30, 2022; published June 30, 2022

Abstract—In this article, the refractive index of an egg white and yolk depending on temperature in the range 30–47°C over 1550 nm was determined. The measurement head was constructed as a fiber optic Fabry-Perot interferometer with interference between the polished fiber end-face and the aluminum weighing dish. The measurement setup was made of an optical spectrum analyzer, superluminescent diode with a central wavelength of 1550 nm, 2:1 fiber coupler and heat plate.

European egg consumption amounts to 240 eggs per person, per year [1]. Eggs provide key sources like proteins, fats, vitamins, minerals and bioactive compounds. The composition of eggs and their net amount could be influenced by hens' age and diet, strain and environmental conditions [2]. The refractive index (RI) could be a potential marker of those factors. The RI of biological cells describes their interaction with light and depends on the concentrations of water and nutrients [3]. In biological samples, establishing a minor change in the refractive index is often more important than the absolute value of the index itself.

In this work, Fabry-Perot interferometers (FPI) were used as sensors to determine the refractive index of egg white and yolk. In order to measure the RI of a liquid biological sample like an egg white or yolk, the measurement setup with an FPI sensor as shown in Fig. 1 was configured. FPI was applied as an optical sensor for measurement of physical parameters due to their high resolution, fast response time. Additionally, fiber-optic sensors are biocompatible and can easily be tuned by modifying their design with optical coatings [4].

The measurement setup was made of an optical spectrum analyzer (Ando AQ6319, Yokohama, Japan) as the optical signal processor, a superluminescent diode with a wavelength of 1550 ± 20 nm and spectral width of 35 nm (SLD-1550-13, FiberLabs Inc., Fujimino, Japan), 2:1 fiber coupler (Lightel, Renton, Washington, USA) and a heat plate (own construction).

In a fiber FPI, the phase of the interference signal is linearly proportional to the optical length of the cavity, defined as the product of cavity length and the refractive index of the medium filling the cavity [5].

The phase shift can be calculated by [6]:

$$\varphi = \frac{4\pi nL}{\lambda}, \quad (1)$$

where φ – the phase shift, n – the refractive index, L – the geometrical path length, λ – the wavelength.

In the experiment, geometrical path length L is the cavity length, which is the distance between the polished fiber end-face and the refractive surface (an aluminum weighing dish).

Information about the measurement is encoded in the full spectrum of light reflected from the sensing interferometer [7]. The optical spectra of FPI filled with air were measured by the optical spectrum analyzer shown in Fig 2. The distance between the sensor head and the reflective surface in the device influences the visibility of the interferometric fringes, as the light beam diverges and is coupled back into the fiber with differing efficiency [8]. The sensitivity of the measurement depends on visibility.

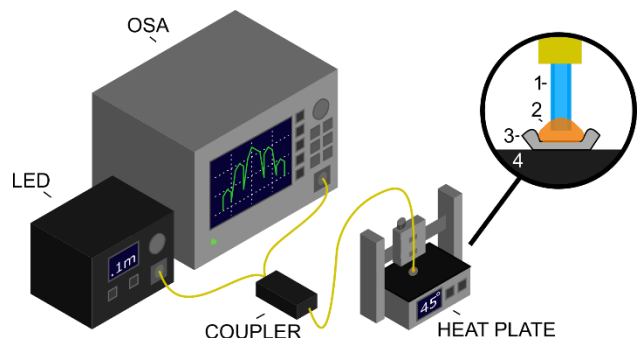


Fig. 1. Measurement setup: (1) fiber, (2) sample, (3) aluminum weighing dish, (4) heat plate.

The measured spectra and cavity length are used to calculate the refractive index of a sample. At first, the estimation of cavity length was conducted by measuring air at room temperature with a built measurement setup using [9]:

* E-mail: patsokol@pg.edu.pl

$$L * n = \frac{1}{2} \left(\frac{\lambda_1 * \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \right), \quad (2)$$

where λ_1 and λ_2 are the wavelengths of two neighboring maxima near the central wavelength position.

As shown in Fig. 2, λ_1 and λ_2 are the center wavelengths of two adjacent minima in the interference spectrum. The refractive index of air at room temperature is 1.0003 at 1550 nm [9].

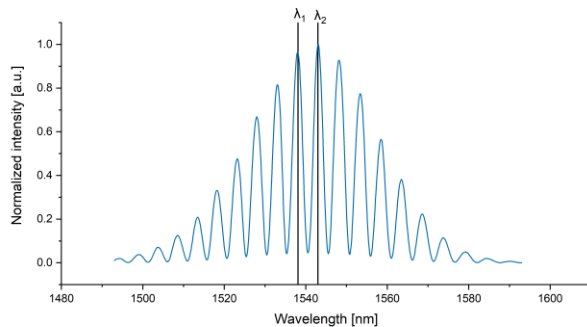


Fig. 2. Spectral signal of cavity filled with air.

During measurements, the cavity length was constant, but changes in the refractive index of the sample in the cavity were impacting optical path length. Equation (2) can be used to calculate either the absolute refractive index n or the geometrical cavity length L . In measurements, the cavity length was set at 238.8 μm for the egg white and 211.7 μm for the egg yolk. Based on the estimated cavity length and the measured sample interference signal, the refractive index was calculated. In Fig. 3, one of the measurement spectra at 35°C was shown. The distance between λ_1 and λ_2 in spectra signals of air and egg differs.

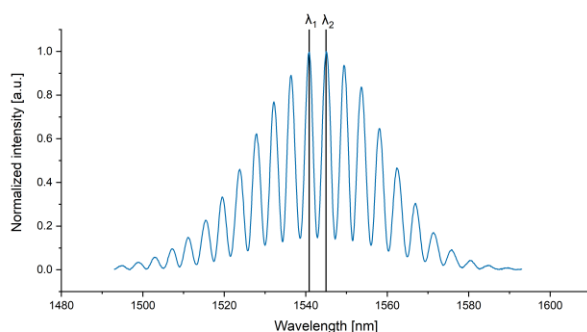


Fig. 3. Spectral signal of egg white at 35°C.

Sample eggs were bought in a supermarket labeled as free-range eggs and the entire box of 6 eggs was measured. The cracked egg was separated to white and yolk, then few milliliters were put on an aluminum weighing dish. Refractive index measurements were performed in a temperature range of 30–47 degrees Celsius, with a step of 1 degree. At each temperature, 6

measurements were performed to determine the median value and to reject measurements that deviate significantly from the other samples' refractive index.

Figures 4a and 4b show the refractive index as a function of temperature. Our measurement focused on the temperature range similar to that of organisms. The refractive index varies between samples, because a different composition of each egg. Boxplot charts were used to show the statistical analysis of the measurement data. The sample represented by the symbol 'o' is an outlier, caused by measurement error. The straight lines inside the boxes indicate a median value based on all measurement series. The distance between the top and bottom edges of the box is the interquartile range (IQR). The dashes indicate minimum and maximum values that were considered as valid. Outlier samples represented by the symbol 'o' are the values that are more than 1.5 IQR away from the box.

The Matlab boxplot algorithm does not always indicate outliers correctly, this can be seen in Fig. 4a. When measured at 46 degrees, the measurements that indicated a value of 1.32 should be counted as outliers. The more measurements that are made, the better the statistics will be and the more erroneous measurements will be detected.

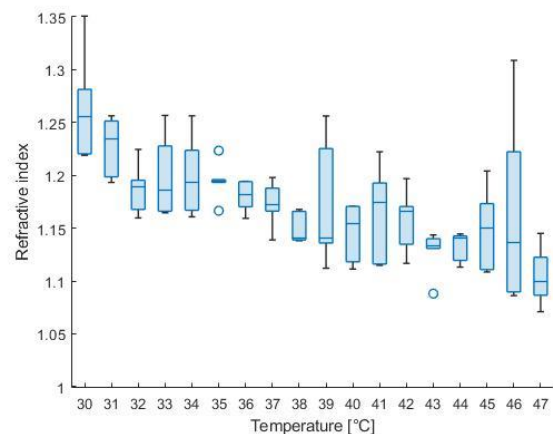


Fig. 4a. Refractive index changes of egg white at 1550 nm.

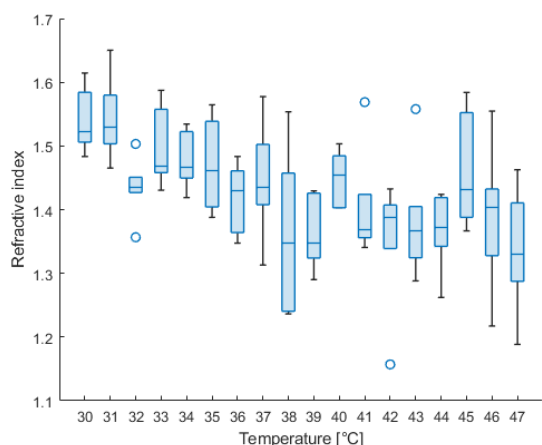


Fig. 4b. Refractive index changes of egg yolk at 1550nm.

Summarizing, the measurement setup allows for determining the refractive index. The obtained results show that refractive index of egg parts strongly depends on temperature and these changes are visible.

This work was supported by the DS programs of the Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of the Gdańsk University of Technology. The financial support was provided by the DEC-1/2021/IDUB/II.2/Np grant under the NEPTUNIUM Enhancing Baltic Region Research Cooperation (Gdańsk University of Technology) and by the 25/2022/IDUB/III.4.1/Tc grant under the TECHNETIUM Talent Management Grants program, which is herein gratefully acknowledged.

References

- [1] P. Magdelaine, "Egg and egg product production and consumption in Europe and the rest of the world, Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products", *Egg Chemistry, Production and Consumption*, 3 (2011). <https://doi.org/10.1533/9780857093912.1.3>
- [2] H. Kuang, F. Yang, Y. Zhang, T. Wang, and G. Chen, "The Impact of Egg Nutrient Composition and Its Consumption on Cholesterol Homeostasis", *Cholesterol* (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/6303810>
- [3] J. Gienger, K. Smuda, R. Müller, M. Bär, J. Neukammer, *Sci. Rep.* **9**, 1 (2019).
- [4] P. Listewnik, M. Hirsch, P. Struk, M. Weber, M. Bechelany, M. Jędrzejewska-Szczerska, *Nanomaterials* **9**, 2 (2019).
- [5] Y. Wu, Y. Zhang, J. Wu, P. Yuan, J. Lightwave Technol. **35**, 19 (2017).
- [6] M. Islam, M. Mahmood, M. Lai, K. Lim, H. Ahmad, *Sensors* **14**, 4 (2014).
- [7] K. Karpieńko, M. Wróbel, M. Jędrzejewska-Szczerska, *Opt. Eng.* **53**, 7 (2014).
- [8] M. Kosowska, D. Majchrowicz, K. Sankaran, M. Ficek, K. Haenen, M. Szczerska, *Materials* **12**, 13 (2019).
- [9] G. Xiao, A. Adnet, Z. Zhang, F. Sun, C. Grover, *Sensors and Actuators* **118**, 2 (2005).

Development of Artificial Urine Using Commonly Available Ingredients for Ultraviolet–Visible Spectroscopy[†]

Patryk Sokołowski *  and Maria Babińska

Department of Metrology and Optoelectronics, Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics, Gdańsk University of Technology, Narutowicza Street 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland; marbabi1@pg.edu.pl

* Correspondence: patsokol@pg.edu.pl

[†] Presented at the 2024 4th International Conference on Social Sciences and Intelligence Management (SSIM 2024), Taichung, Taiwan, 20–22 December 2024.

Abstract: A simple urine phantom was developed to replicate the ultraviolet–visible (UV–Vis) spectrum of healthy human urine. Made from four safe and widely available ingredients, it addresses the challenges of biological samples, including safety risks and storage issues. The spectroscopic analysis results confirmed strong similarity to natural urine, making the phantom appropriate for testing spectroscopic methods, calibrating optical devices, and evaluating diagnostic sensors. It can also serve as a starting point for advanced phantoms tailored to specific patient needs or diseases. This reliable alternative facilitates research in optical diagnostics or biosensor development by simplifying preliminary sensor testing.

Keywords: artificial urine; optical method

1. Introduction

Contemporary science addresses increasing challenges by developing safe, effective, and ethical research methods. One significant development is phantoms—artificially created materials that simulate the properties of biological counterparts [1,2]. In this context, the development of a urine phantom that accurately replicates the ultraviolet–visible (UV–Vis) spectrum of human urine provides new opportunities in medical diagnostics and the validation of analytical technologies. Urine diagnostics plays a crucial role in medicine, as it is a non-invasive method that enables the detection of a wide range of diseases, including urinary tract infections, diabetes, kidney disorders, and even early cancer detection [3–5]. Optical methods, such as UV–Vis spectroscopy, enable the accurate identification of biomarkers present in urine [6–8].

The use of phantoms offers significant practical and technical advantages. Utilizing biological materials in research requires adherence to safety protocols, specific storage conditions, and obtaining bioethical approvals, which require substantial costs and limit the availability of such samples. Phantoms address these issues by providing an alternative that reduces the risks associated with exposure to potentially hazardous samples and enables research under standard laboratory conditions without the need for highly specialized personnel [9]. Furthermore, phantoms are durable, easy to store, and simple to produce, which further enhances their practical utility.

This study aims to develop a simple, cost-effective, and safe urine phantom whose optical properties in the UV–Vis range closely replicate those of healthy human urine [10,11]. This study involved the creation of a urine phantom with optical properties resembling real urine in the UV–Vis spectrum, as well as an analytical component, consisting of a



Academic Editors: Teen-Hang Meen, Liza Lee and Cheng-Fu Yang

Published: 5 June 2025

Citation: Sokołowski, P.; Babińska, M. Development of Artificial Urine Using Commonly Available Ingredients for Ultraviolet–Visible Spectroscopy. *Eng. Proc.* **2025**, *98*, 5. <https://doi.org/10.3390/engproc2025098005>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

comparison of its spectrum with biological samples. This comparison results provide the basis for further research into the potential applications of this phantom in analytical technology. It is worth emphasizing that, to date, no urine phantom has been developed that unequivocally reproduces the UV–Vis spectrum of biological samples. Therefore, the presented phantom represents an innovative solution that can be applied in research on diagnostic sensors and the validation of optical analytical methods.

The proposed phantom was prepared using only four ingredients, which are widely available, inexpensive, and safe, making it easy to reproduce in any laboratory. The composition of the phantom was optimized to achieve a UV–Vis spectrum that closely replicates the characteristic spectrum of human urine. Due to this high level of conformity, the phantom can be effectively used for the validation of spectroscopic methods and testing sensors under laboratory conditions before their application in clinical diagnostics. Additionally, the phantom enables preliminary studies to be conducted quickly and cost-effectively, contributing to the acceleration of work on new diagnostic technologies.

The uniqueness of the developed phantom lies in its simplicity, minimal number of components, low production cost [12,13], and high compatibility with the UV–Vis spectrum of biological samples. This innovative solution enables preliminary experiments for further research into advanced models that simulate additional biological properties of urine, such as pH variability, ionic composition, or the presence of disease biomarkers. The developed phantom represents a significant step in creating easily accessible diagnostic tools, supporting the advancement of optical and sensor technologies in medical and analytical research [13–15].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

To create artificial urine for sensor validation, the key components of the spectra must be replicated. The formula included water as the base, which was also the base of artificial urine. Another important component was mineral salts, which were obtained by adding a phosphate-buffered saline (PBS) solution (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, USA). Urea and uric acid are other crucial elements of urine, and the absorbance is dominated by acid. In the artificial urine, we added citric acid (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) and a mix of acetylsalicylic acid and ascorbic acid (Bayer AG, Leverkusen, Germany). These acids are readily available (in products like aspirin), and safer compared to other acids, and their spectral properties closely resemble those of uric acid. To enhance the color to resemble natural urine and improve the absorption spectrum, a black tea infusion (Mokate, Ustron, Poland) was added at the final stage. The black tea provided a color similar to urine. The caffeine present in the infusion improved the absorption spectrum in a range of 250–300 nm. The caffeine content depends on the time of brewing.

The components were selected for their easy availability and safety. The phantom was fabricated using only four components, highlighting its simplicity and accessibility. Four components were used: PBS solution (Sigma-Aldrich, USA), an aspirin tablet (Bayer, Germany), citric acid (Sigma-Aldrich, USA), and a tea infusion (Mokate, Poland) [16]. This allowed a phantom to be reproduced quickly and cheaply in any laboratory, without the need for complex procedures. The resulting product of combining the above components is shown in Figure 1. The order in which the ingredients were added was not important. The proportions and concentrations of the individual components were crucial. The developed phantom exhibited a color and appearance that closely mimicked that of natural urine, making it suitable for visual and spectroscopic studies requiring realistic substitutes.



Figure 1. Developed urine phantom in this study.

2.2. Method

For absorbance measurement, we used a Nanodrop One C (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) spectrometer. The wavelength range was 190–850 nm with a photometric accuracy of 3% at 302 nm. The bandwidth was ≤ 1.8 nm. The measuring device was used to detect materials at low concentrations. A sample volume of 2 μL was used for each measurement. All measurements were conducted at room temperature. For the measurements, urine from a patient and artificially produced urine were used. After the measurements, the obtained spectra were compared by checking the coincidence of the peaks (Figure 2).

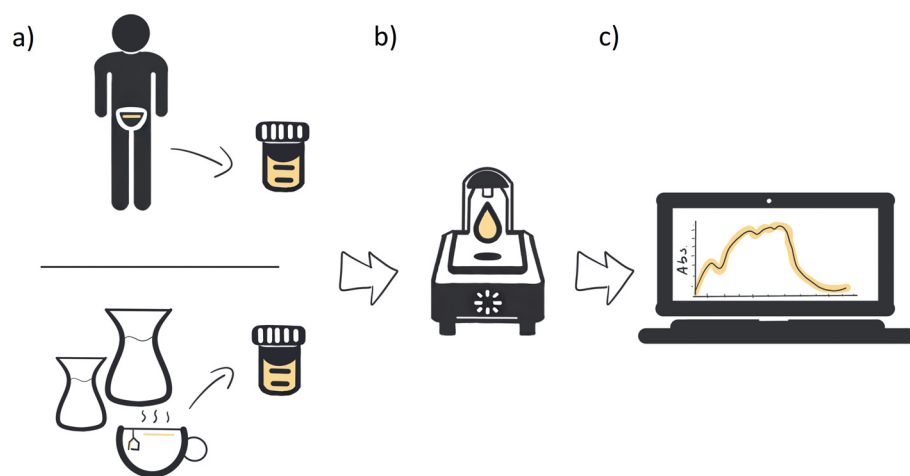


Figure 2. Schematic diagram of the method: (a) patient's sample or phantom fabrication, (b) spectroscopic measurements, and (c) spectra comparison.

3. Results and Discussion

The measured results (Figure 3) showed that the artificial urine closely matched the spectra of real human urine across the UV and visible range. The main peaks aligned with differences only in signal intensity.

The spectrum from each patient varied slightly due to different concentrations, depending on the patient's condition, diet, and medication intake. By adjusting the concentration of individual components in the artificial urine, it was possible to make slight adaptations to match the conditions of specific patients. Also, changes occurring in the phantom over time were tested. Spectral variations were evident in the signal intensity. Notably, absorption values increased in the range of 240–280 nm. In this way, the phantom's spectra were

adjusted to the urine spectrum. However, this is not essential for sensor validation, as the relevant range of interest changes only marginally.

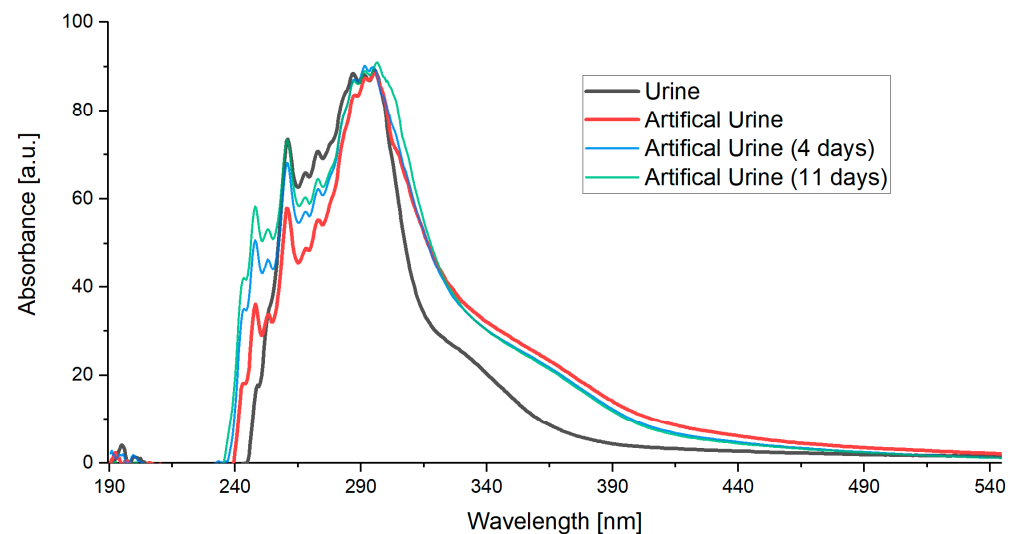


Figure 3. Obtained spectra of urine and artificial urine.

4. Conclusions

Artificial urine was formulated that accurately reflected the UV-Vis spectrum. We achieved the desired spectral range using only a few components, which is a significant accomplishment considering the complexity and number of constituents in natural urine. We did not replicate the chemical composition of natural urine, as the quantity and diversity of its components, as well as their availability, make it challenging to reproduce. The formulated phantom mirrors the optical characteristics of natural urine and provides a consistent and reproducible medium for experimental research. It can be adapted to create more advanced phantoms tailored to the specific optical properties of individual patients or particular diseases.

Author Contributions: Conceptualization, P.S. and M.B.; methodology, P.S. and M.B.; investigation, P.S. and M.B.; writing—original draft preparation, P.S. and M.B.; writing—review and editing, P.S. and M.B.; visualization, P.S. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project is supported by DS programs of the Faculty of Electronics, Telecommunications and Informatics of Gdańsk Tech, by the 14/1/2024/IDUB/III.4.1/Tc and 7/1/2024/IDUB/III.4c/Tc grants under the TECHNETIUM Talent Management Grants program at Gdańsk Tech and COST (European Cooperation in Science and Technology) [CA21159].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Upon request to interested researchers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Suardi, N.; Ahmad, M.; Shukri, A.; Mohammad, H.; Oglat, A.; Alarab, A.; Makhamrah, O. Chemical characteristics, motivation and strategies in choice of materials used as liver phantom: A literature review. *J. Med. Ultrasound* **2020**, *28*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Karpienko, K.; Gnyba, M.; Milewska, D.; Wróbel, M.S.; Jędrzejewska-Szczerska, M. Blood Equivalent Phantom vs Whole Human Blood, a Comparative Study. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]

3. Urinalysis: A Wealth of Information in Just a Few Drops. Available online: <https://www.siemens-healthineers.com/perspectives/urinalysis-a-wealth-of-information> (accessed on 27 December 2024).
4. Władziński, A.; Kosowska, M.; Wityk, P.; Łuczkiewicz, A.; Gnyba, M.; Szczerska, M. Biomarker Detection in the Wastewater Phantom. *J. Biophotonics* **2025**, *13*, e202500003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Babińska, M.; Władziński, A.; Talaśka, T.; Szczerska, M. Machine Learning Enhanced Optical Fiber Sensor for Detection of Glucose Low Concentration in Samples Mimicking Tissue. *Photon-Lett. Pol.* **2025**, *17*, 20–22. [[CrossRef](#)]
6. Alijaj, N.; Pavlovic, B.; Martel, P.; Rakauskas, A.; Cesson, V.; Saba, K.; Hermanns, T.; Oechslin, P.; Veit, M.; Provenzano, M.; et al. Identification of Urine Biomarkers to Improve Eligibility for Prostate Biopsy and Detect High-Grade Prostate Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Yaacob, A.; Ngajikin, N.H.; Rashid, N.C.A.; Ali, S.H.A.; Yaacob, M.; Isaak, S.; Cholan, N.A. Uric Acid Detection in Visible Spectrum. *TELKOMNIKA Telecommun. Comput. Electron. Control.* **2020**, *18*, 2035–2041. [[CrossRef](#)]
8. Sokolowski, P.; Wityk, P.; Cierpiak, K.; Babińska, M.; Graczyk, W.; Krawczyk, B.; Markuszewski, M.; Szczerska, M. Optical method supported by machine learning for urinary tract infections discrimination and bladder cancer detection. In Proceedings of the Optical Sensing and Detection VIII, Strasbourg, France, 20 June 2024; p. 85.
9. Gorpas, D.; Wabnitz, H.; Pfefer, T.J. Special Section Guest Editorial: Tissue Phantoms to Advance Biomedical Optical Systems. *J. Biomed. Opt.* **2022**, *27*, 074701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A.C.; Wilson, M.R.; Knox, C.; Bjorn Dahl, T.C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; et al. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sarigul, N.; Korkmaz, F.; Kurultak, I. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sieryi, O.; Popov, A.P.; Kalchenko, V.; Bykov, A.V.; Meglinski, I. Tissue-mimicking phantoms for biomedical applications. In Proceedings of the Tissue Optics and Photonics, Online, 12 May 2020; p. 1136312.
13. Esmonde-White, F.W.L.; Esmonde-White, K.A.; Kole, M.R.; Goldstein, S.A.; Roessler, B.J.; Morris, M.D. Biomedical tissue phantoms with controlled geometric and optical properties for Raman spectroscopy and tomography. *Analyst* **2011**, *136*, 4437–4446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cuper, N.J.; Klaessens, J.H.G.; Jaspers, J.E.N.; de Roode, R.; Noordmans, H.J.; de Graaff, J.C.; Verdaasdonk, R.M. The use of near-infrared light for safe and effective visualization of subsurface blood vessels to facilitate blood withdrawal in children. *Med. Eng. Phys.* **2013**, *35*, 433–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brooks, T.; Keevil, C.W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *3*, 203–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Babińska, M.; Władziński, A. Application of UV-VIS Spectroscopy and Machine Learning Methods in Glucosuria Diagnostics: A Phantom Study. *Photonics Lett. Pol.* **2025**, *17*, 16–19. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.