

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola
Marek József Klinikai és
Élelmiszerlánc-biztonsági
Állatorvostudományok Doktori Program



Gépi tanulás alkalmazása, fejlesztése az
állatitermék-előállítási folyamatok értékeléséhez

PhD-értekezés

Nagy Sára Ágnes

2023

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Marek József Klinikai és Élelmiszerlánc-biztonsági Állatorvostudományok Doktori Program

Társtémavezetők:

.....
Dr. Solymosi Norbert, PhD
Bioinformatikai Központ
Állatorvostudományi Egyetem

.....
Dr. Gábor György, kandidátus
Androvet Kft.

Készült 4 példányban, ez a(z) számú példány.

.....
Nagy Sára Ágnes

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	v
1. Összefoglalás	1
2. Summary	3
3. Bevezetés	5
4. Irodalmi áttekintés	7
4.1. A gépi tanulás szakirodalmi összefoglalása	7
4.2. A vizsgálatok során érintett témák szakirodalmi összefoglalása	21
5. Anyag és módszer	27
5.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének vizsgálata	27
5.2. Neurális hálózat tanítása kondíciópontosításra	30
5.3. Neurális hálózat kombinációja hagyományos diagnosztikai módszerrel	36
5.4. Neurális hálózat tanítása mikrobiológiai adatokkal	38
6. Eredmények	43
6.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének és mobilitásuk szilázsban	43
6.2. Tejelő tehének kondíciópont-predikciójának pontossága	46
6.3. Szomatikussejtszám-növekedés predikciójának pontossága	52
6.4. Baktériumtelepek növekedésének becslési pontossága	55
7. Megbeszélés	59
7.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének szilázsban	59
7.2. Tejelő tehének kondíciópontosítása neurális hálózatokkal	65
7.3. Tej szomatikus sejtszám növekedésének predikciója neurális hálózat-támogatással	68
7.4. Baktériumtelepek növekedésének becslése mély tanulással	70
7.5. Kitekintés: a gépi tanulás jelene és jövője	71
8. Új tudományos eredmények	73
8.1. Antimikrobiális rezisztencia gének és mobilitásuk szilázs mintákban	73
8.2. Tejelő tehének kondíciópontosítása neurális hálózatokkal	73
8.3. Tej szomatikus sejtszám növekedésének predikciója neurális hálózat-támogatással	73
8.4. Baktériumtelepek növekedésének becslése mély tanulással	73
9. Köszönetnyilvánítás	75
Irodalomjegyzék	77
A doktori kutatás eredményeinek közlései	93
10. A dolgozat alapját képező teljes terjedelmű közlemények	96
10.1. Antimicrobial resistance determinants in silage	96
10.2. Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction	106
10.3. Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction	118
10.4. Bacterial colony size growth estimation by deep learning	125
10.5. Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection	131
10.6. Mesterséges neurális hálózatok az állatitermék-előállításban	137
10.7. Statisztikai ellenőrző diagramok az állatitermék-előállításban	148

Rövidítések jegyzéke

AI	Artificial intelligence – <i>Mesterséges intelligencia</i>
AMU	Antimicrobial use – <i>Antibiotikum használat</i>
AMR	Antimicrobial resistance – <i>Antimikrobiális rezisztencia</i>
ANN	Artificial neural network – <i>Mesterséges neurális hálózat</i>
AP50	Average precision 50%-os IoU-nál
ARG	Antimicrobial resistance gene – <i>Antimikrobiális rezisztencia-gén</i>
AUC	Area under the curve – <i>Görbe alatti terület</i>
BCS	Body condition score – <i>Kondíciópont</i>
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CMT	California Mastitis Test
CNN	Convolutional neural network – <i>Konvolúciós neurális hálózat</i>
COCO	Common Objects in Context
DIM	Days in milk – <i>Elléstől eltelt napok száma</i>
DL	Deep learning – <i>Mély tanulás</i>
dsDNS	Double stranded DNA – <i>Duplaszálú DNS</i>
DT	Decision tree – <i>Döntési fa</i>
EMA	European Medicines Agency – <i>Európai Gyógyszerügynökség</i>
FN	False negative – <i>Téves negatív</i>
FP	False positive – <i>Téves pozitív</i>
GI	Gastrointestinal – <i>Gasztrointesztinális</i>
GPU	Graphics processing unit – <i>Grafikai processzor</i>
HGT	Horizontal gene transfer – <i>Horizontális géntranszfer</i>
HPCIA	Highest-Priority Critically Important Antibiotics – <i>Magas prioritású, kritikusan fontos antibiotikumok</i>
iMGE	Integrative Mobile Genetic Elements – <i>Integratív mobilis genetikai elem</i>
IMI	Intramammary infection – <i>Tőgygyulladás</i>
IoU	Intersection over Union
IQR	Interquartile range – <i>Interkvartilis terjedelem</i>
MCC	Matthews correlation coefficient – <i>Matthews-féle korrelációs együttható</i>
ML	Machine learning – <i>Gépi tanulás</i>
MSEP	Mean square error of prediction – <i>A predikció átlag, négyzetes hibája</i>
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-generation sequencing – <i>Újgenerációs szekvenálás</i>
NPV	Negative predictive value – <i>Negatív prediktív érték</i>
ORF	Open reading frames – <i>Nyitott leolvasási keret</i>
PA	Precision agriculture – <i>Precíziós mezőgazdálkodás</i>
PCR	Polymerase chain reaction – <i>Polimeráz láncreakció</i>

PPV	Positive predictive value <i>Pozitív prediktív érték</i>
PLF	Precision livestock farming – <i>Precíziós állattartás</i>
PVM	Precision veterinary medicine – <i>Precíziós állatorvoslás</i>
RF	Random forest
RGI	Resistance Gene Identifier
RMSEP	Root mean square error of prediction – <i>A predikció átlagos négyzetes hibájának gyöke</i>
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCC	Somatic cell counts – <i>Szomatikus sejtszám</i>
SM	Subclinical mastitis – <i>Szubklinikai tőgygyulladás</i>
ssDNS	Single stranded DNA – <i>Egyszálas DNS</i>
SRA	Sequence Read Archive
TF-IDF	Term Frequency-Inverse Document Frequency
TN	True negative – <i>Valódi negatív</i>
TP	True positive – <i>Valódi pozitív</i>
TSB	Tryptic soy broth – <i>Tripton szójaleves</i>

1. Összefoglalás

Széleskörűen elfogadott tény, hogy az emberiség növekvő lélekszáma, az élelmiszerekkel és állattenyésztéssel szemben támasztott növekvő minőségi igények, a klimatikus viszonyok megváltozása egyre nagyobb terhet rónak a mezőgazdaságra világszerte. A piac felől érkező folyamatosan változó minőségi és mennyiségi igények miatt az agrárium is változásra kényszerül. Napjainkban precíziós mezőgazdaság nélkül elképzelhetetlen a költséghatékonyság fokozása és a környezeti terhelés csökkentése nagyüzemi szinten. A precíziós növénytermesztés, állattartás és állatorvoslás során nagy mennyiségű adat keletkezik, aminek használható információvá alakításában egyre gyakrabban használjuk a mesterséges intelligencia eszköztárát („big data” elemzési módszerek).

Doktori munkámban a mesterséges intelligencia (AI) egyik területének, a gépi tanulásnak (ML), az állattermék-előállításban való alkalmazhatóságát vizsgáltam. A kutatás az élelmiszerlánc több pontját is célba vette, kezdve a takarmány mikrobiológiai értékelésétől, az állatjóléti és állategészségügyi kérdéseken át, egészen az élelmiszer-biztonsági vizsgálati módszerekig.

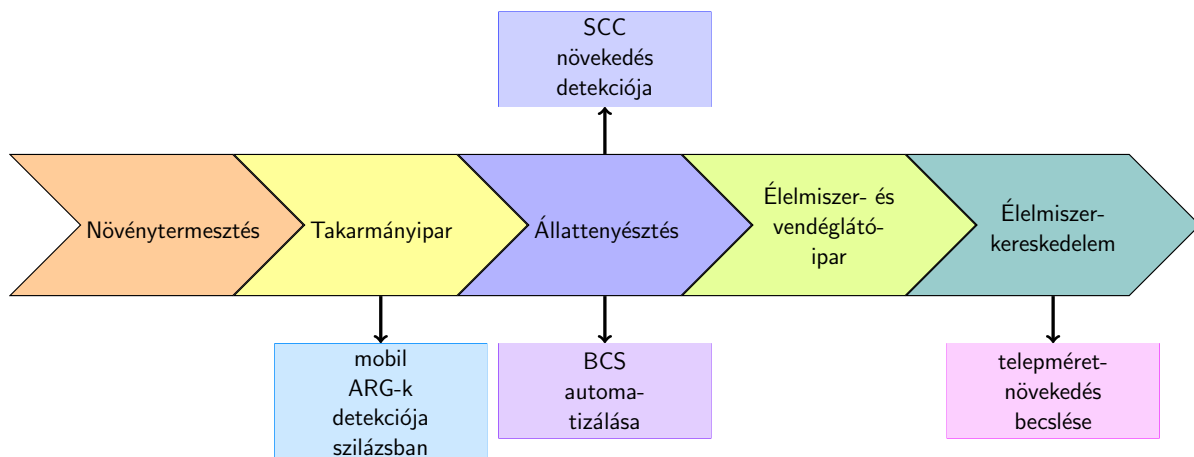
Az első kutatásban szilázsminták metagenomját vizsgáltuk antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k) jelenléte után kutatva, azon belül is elsősorban mobilis változatokat kerestünk. Célunk az volt, hogy a takarmányminták genetikai elemzésével, olyan rezisztencia géneket keressünk, melyek potenciálisan tovább juthatnak az állattermék-előállítás későbbi szakaszaiba, a végső fogyasztóhoz is akár. A metagenom analízis során talált mobilis rezisztencia gének nagy aránya arra enged következtetni, hogy az antimikrobiális rezisztencia terjedésének az állati eredetű élelmiszer is egy valószínűsíthető útja lehet, így a jövőben érdemes ennek nagyobb figyelmet szentelni.

A következő vizsgálatban egy, a tejelő szarvasmarha-tartásban széleskörűen alkalmazott módszer, a kondíciópontozás automatizálására tettünk kísérletet. A testkondíciópont (BCS) információval szolgál a test zsír- és energiaraktárak telítettségéről, így fontos útmutatást adhat az állattartó és az állatorvos számára, hiszen a kondíciópont elmozdulása az ideális értéktől a termelésben bekövetkező változásokkal jár. Tejelő tehének esetében számos megbetegedés köthető a BCS változásához, ezért kiemelten fontos a kondíció folyamatos monitorozása. Kutatásunkban olyan mesterséges neurális hálózatokat (ANN) hoztunk létre, melyek képesek a BCS predikciójára videófelvételek alapján. A modellünk a későbbiekben alkalmas lehet egy automatizált BCS pontozó rendszer alapját képezni.

A tejelő szarvasmarha-tartásban a legnagyobb kártétellel járó fertőző megbetegedést, a tőgygyulladást, is érintettük munkánk során. Vizsgálatunk tárgyát a szubklinikai tőgygyulladás diagnosztikája képezte. Célunk az volt, hogy a Magyarországon átlagosnak mondható telepi felszereltséggel kinyerhető adatokból, szubklinikai tőgygyulladással összefüggésbe hozható szomatikus sejtszám (SCC) emelkedésre vonatkozó diagnózist állíthassunk fel. Ebben az esetben neurális hálózatok predikciója mellett, azt is vizsgáltuk, hogy hogyan javíthatók a predikciós értékek egy független teszttel kombinálva. Az eredményeink rámutatnak arra, hogy a tejleadással kapcsolatos, könnyen elérhető adatokon alapuló neurális hálózatok független teszttel alkalmazott sorozatkombinációja, lehetőséget nyújthat a szubklinikai tőgygyulladás hatékony detekciójára telepi körülmények között.

Végül munkámban kitérek a bakteriális telepnövekedés vizsgálatára is. Mint ismeretes a baktériumok szaporodásának sebességét alapvetően befolyásolják a környezet és a baktérium sajátosságai. A baktériumszaporodás mértéke patogenitási és élelmiszer-biztonsági jelentőséggel bír. Ezért a baktériummennyiség időegység alatt történő növekedésének (szaporodási rátájának) vizsgálata orvosi, állatorvosi szempontból fontos információt jelent. A baktériumtelepek neurális hálózattal történő detektálása ismert módszer a szakirodalomban, azonban ahhoz, hogy a növekedési sebességet tudjuk vizsgálni, a lehető legpontosabban kell tudnunk mérni a detektált telepek méretét. Munkánkban egy korábbi kísérletben létrehozott, saját anotációjú, digitális képfelvételekből álló adathalmazon tanított neurális hálózatot hoztunk létre, amely képes baktériumtelepek növekedési sebességének megbízható predikciójára.

A dolgozatomban olyan új módszereket mutatok be, melyek az állattermék-előállítás folyamatának több pontján alkalmazhatók a termelés javításának érdekében (1.1. ábra). Ehhez, a manapság egyre nagyobb figyelemnek örvendő, mesterséges intelligenciát, azon belül mély tanulási (DL) módszereket használtunk. Munkáman rámutatok, hogy a neurális hálózatokat hatékonyan alkalmazhatók az általunk megoldani kívánt problémák esetében.



1.1. ábra. A doktori munkámban vizsgált kérdések az állattermék-előállítás viszonyában. BCS: kondíciópont, ARG: antimikrobiális rezisztencia gén, SCC: a tej szomatikus sejt száma

2. Summary

It is widely acknowledged that the growing human population, the increasing quality demands on food and livestock production, and changing climatic conditions are placing increasing pressure on agriculture worldwide. The ever-changing qualitative and quantitative demands of the market are also forcing agriculture to change. Today, without precision agriculture, it is inconceivable to increase cost efficiency and reduce environmental pressures on a large scale. Precision crop, livestock and veterinary production generates large amounts of data, which is increasingly being transformed into usable information using artificial intelligence (AI) tools ('big data' methods).

In my doctoral thesis, I investigated the applicability of machine learning (ML), one of the fields of artificial intelligence, in livestock sector. The research targeted several points in the food chain, ranging from microbiological evaluation of forage, animal welfare and animal health issues, to food safety testing methods.

In the first study, the metagenome of silage samples was analysed for the presence of antimicrobial resistance genes (ARGs), with a focus on mobile variants. Our aim was to use genetic analysis of feed samples to search for resistance genes that could potentially be passed on to downstream stages of animal production, including the final consumer. The high proportion of mobile resistance genes found in the metagenome analysis suggests that the animal source food could be a potential path of antimicrobial resistance transmission, and thus it is recommended to pay more attention to this in the future.

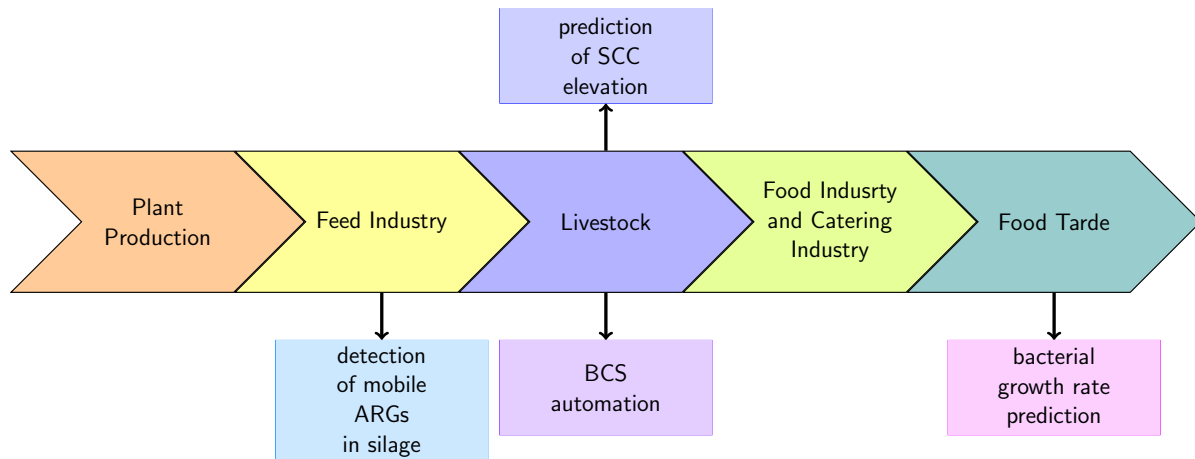
In the following study, we tested the automation of body condition scoring which is a widely used method in dairy farming. The body condition score provides information on the saturation of body fat and energy stores and can therefore provide an important guide for the farmer and the veterinarian, as a shift in the condition score (BCS) away from the ideal value is associated with decline in production. In dairy cows, many diseases can be associated with changes in BCS and therefore continuous monitoring of condition is essential. In our research, we have created artificial neural networks (ANNs) capable of predicting BCS from video recordings. Our model may be suitable to become part of an automated BCS scoring system.

We also dealt with the most damaging infectious disease in dairy farming, namely the mastitis. We investigated the diagnostics of subclinical mastitis. Our aim was to develop a diagnostic tool for somatic cell count (SCC) elevation related to subclinical mastitis which uses data collected with average farm equipment in Hungary. Along with the prediction of neural networks, we also investigated how the prediction values could be improved by combining them with an independent test. Our results indicate that a serial combination of neural networks with an independent test, based on readily available data on milk yield, may offer the possibility of an efficient, on-farm test of subclinical mastitis.

The final part of my thesis will examine bacterial colony growth. It is well known that the rate of bacterial growth is fundamentally influenced by the environment and the characteristics of the bacterium. The rate of bacterial growth is an important factor for pathogenicity and food safety. Therefore, the investigation of the bacterial growth (multiplication rate) per unit of time is important information from a medical and veterinary point of view. The detection of bacterial colonies by neural network is a well-known method in the literature, but in order to be capable of

investigating the growth rate, we need to be able to measure the size of the detected colonies as accurately as possible. In our work, we have created a neural network trained on a dataset of digital photographs, created in a previous study with our own annotations, which is able to perform reliable prediction of bacterial colony growth rates.

In my thesis, I present novel methods that can be applied at multiple points in the animal production to improve efficiency (Figure 2.1). To this purpose, we have used artificial intelligence, including deep learning (DL) methods, which is gaining increasing attention nowadays. In my work, I show that neural networks can be effectively applied to the problems we want to solve.



2.1. ábra. The topics examined in my doctoral thesis in relation to the production of animal products. BCS: body condition score, ARG: antimicrobial resistance gene, SCC: somatical cell count

3. Bevezetés

Az agrárium elvitathatatlan gazdasági tényező az emberiség történelmében az egész világon. Nincs ez másként jelenlegi, globalizált világunkban sem. A folyamatosan növekvő népesség egyre nagyobb nyomást gyakorol a mezőgazdaságra (Liakos és mtsai. 2018). Az állattermékek, mint a hús, tej és tojás fogyasztása a fejlett országokban ugyan kiegyenlítettnek mondható, de a fejlődő országokban növekedést mutat (Halachmi és mtsai. 2019). A növekvő mennyiségi igényeken felül a fogyasztók elvárásai a minőséget tekintve is egyre magasabbak. Egyrészt a fogyasztók igényei, másrészt a hatályban lévő jogszabályok megkövetelik a mezőgazdasági szereplőtől a környezetvédelmi fenntarthatóságot, az etikus állattartás és az állatjóléti előírások teljesítését minden állat számára. Ezek egyre nagyobb terhet rónak világszerte a mezőgazdaságra (Benos és mtsai. 2021). Mindezen elvárások teljesítése mellett a gazdálkodó kénytelen a jövedelmezőséget is szem előtt tartani (Bahlo és mtsai. 2019).

A növekvő mennyiségi, és ezzel párhuzamosan bővülő minőségbeli elvárások kielégítését célzó megoldást jelenthetné az automatizáció, technológiai innováció, és a precíziós mezőgazdaság (PA) (Monteiro és mtsai. 2021). A PA egy olyan modern technológián alapuló adatintenzív gazdálkodási módszer (Monteiro és mtsai. 2021), amely a hagyományos mezőgazdaság retrospektív elemzési módszereivel ellentétben, valós idejű, különböző forrású adatok azonnali feldolgozásával, képes a gyors döntéshozatali folyamatra, esetleg azonnali beavatkozásra (Kleen, Guatteo, 2023). A PA technológiák magukban foglalják a mezőgazdaság teljes spektrumát, a zöldség-, gyümölcs- és szántóföldi-növénytermesztési ciklus szakaszait (talaj-előkészítés, vetés, növénykezelés és betakarítás, stb.), továbbá az állattenyésztés minden elemét (takarmányozás-, állatjólét-, állategészségügyi állapot-, termelés monitorozása, stb.).

A PA állattenyésztéssel foglalkozó területe a precíziós állattartás (PLF) (Monteiro és mtsai. 2021). A PLF a PA-hoz hasonlóan tulajdonképpen olyan folyamatos, valós idejű, automatikus adatgyűjtési technológiák összessége, amelyek az állattermék-előállítás mozzanataira fókuszálva lehetőséget nyújtanak annak kvantitatív értékelésére (Halachmi és mtsai. 2019). Az állattartó időben értesül egy probléma megjelenéséről, így időben tud beavatkozni (Berckmans, 2014). A PLF elsődleges célja az, hogy az állattartást gazdaságilag, szociálisan és környezetvédelmi szempontból is fenntarthatóvá tegye megfigyeléseken, viselkedésmintázatok értelmezésén, és ha lehet, egyed szintjén történő felügyeletén keresztül (Tullo és mtsai. 2019).

A PLF mellett a jövőben egyre nagyobb szerephez juthat a precíziós állatorvoslás (PVM) is. Jelenleg a precíziós orvoslás fókuszpontja elsősorban a humán orvosláson van, azonban az állatorvoslás, azon belül is a haszonállat-gyógyászat profitálhat az orvosláson területén elért eredményekből (Lloyd és mtsai. 2016). A PVM figyelembe veszi a beteg genetikai variációját, a betegség kialakulásában és kórfejlődésében szerepet játszó tényezőket egyed és állomány szinten egyaránt (Lloyd és mtsai. 2016). A PVM lehetőséget kínál arra, hogy célzottan alkalmazzuk az ideális gyógykezelést, optimális dózisban, a megfelelő egyed(ek)en (Lloyd és mtsai. 2016).

A precíziós növénytermesztés, állattartás és állatorvoslás során nagy mennyiségű adat keletkezik, aminek használható információvá alakításában (Nagy és mtsai. 2017) egyre gyakrabban használjuk a mesterséges intelligencia eszköztárát („big data” elemzési módszerek) (Cockburn, 2020).

Doktori munkámban egyrészt tanulmányoztam a PLF módszertanába illeszthető gépi tanulási modelleket az állattenyésztés folyamatában, másrészt a PLF alkalmazási területén túl az állattermék-előállítás több pontján is alkalmaztam ezen eljárásokat.

Ehhez először a tejlő tehenészetekben fontos tömegtakarmány, a szilázs antimikrobiális rezisztenciagén-tartalmát vizsgáltam (Nagy és mtsai. 2022). Feltételeztük, hogy a szilázsban a fermentáció során az ARG-k feldúsulnak az erjesztett tejtermékekhez hasonlóan (Tóth és mtsai. 2020b). Mivel ennek leírása a szilázsra vonatkozóan nem található meg a szakirodalomban, elhatároztuk, hogy szabadon hozzáférhető, újgenerációs szekvenálási (NGS) shotgun metagenom-adatkészleteket vizsgálunk egy egységesített bioinformatikai eljárással. A cél szilázs mintákból származó ARG-k diverzitásának, bakteriális rokonságának és mobilitási potenciáljának vizsgálata volt.

Kutatásom céljai közt szerepelt továbbá Holstein-fríz fajtájú tehenek testkondíciójának automatikus pontozására alkalmas algoritmusok fejlesztése. Azt vizsgáltam, hogy a felügyelt gépi tanulás, különösen a mély konvolúciós neurális hálózat (CNN) alapú Detectron2 (Wu és mtsai. 2019) modellek milyen pontossággal használhatók az általam becsült BCS-osztályok predikciójára egy egyszerű RGB-kamerával, tehenekről készült képek alapján (Nagy és mtsai. 2023c). Továbbá tanulmányoztam szubklinikai tőgygyulladás korai detekciójának megbízhatóságát javító gépi tanulási eljárásokat. Valamint akár az állati takarmányokban, akár az állati-eredetű élelmiszerekben előforduló, azokon keresztül fertőzni képes baktériumok növekedési képességének vizsgálata szintén kutatásom tárgyát képezték.

Kutatásaim célja továbbá részben az volt, hogy gépi tanulási módszereket sajátítsak el, azokat használni, fejleszteni tudjam, ennek megfelelően az említett/bemutatandó munkákat végeztem el.

A munkám alapját képező közlemények teljes terjedelemben megtalálhatók a dolgozat végen a mellékletben.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A gépi tanulás szakirodalmi összefoglalása

Mivel az állatitermék-előállítás egy összetett folyamat (Wathes és mtsai. 2008), a termeléssel összefüggő, adatok feldolgozása olyan statisztikai modellt igényel, amely képes nagy mennyiségű, szerteágazó adat típusokból automatikusan predikciót létrehozni. Erre nyújt lehetőséget – többek között – a mesterséges intelligencia eszköztára, pl.: a gépi tanulás. A következőekben a mesterséges intelligenciáról, azon belül is a gépi tanulásról adok összefoglaló leírást, a gépi tanulás főbb jellemzőit, alkalmazhatóságát bemutatva.

4.1.1. Gépi tanulás általánosságban

4.1.1.1. Mesterséges intelligencia

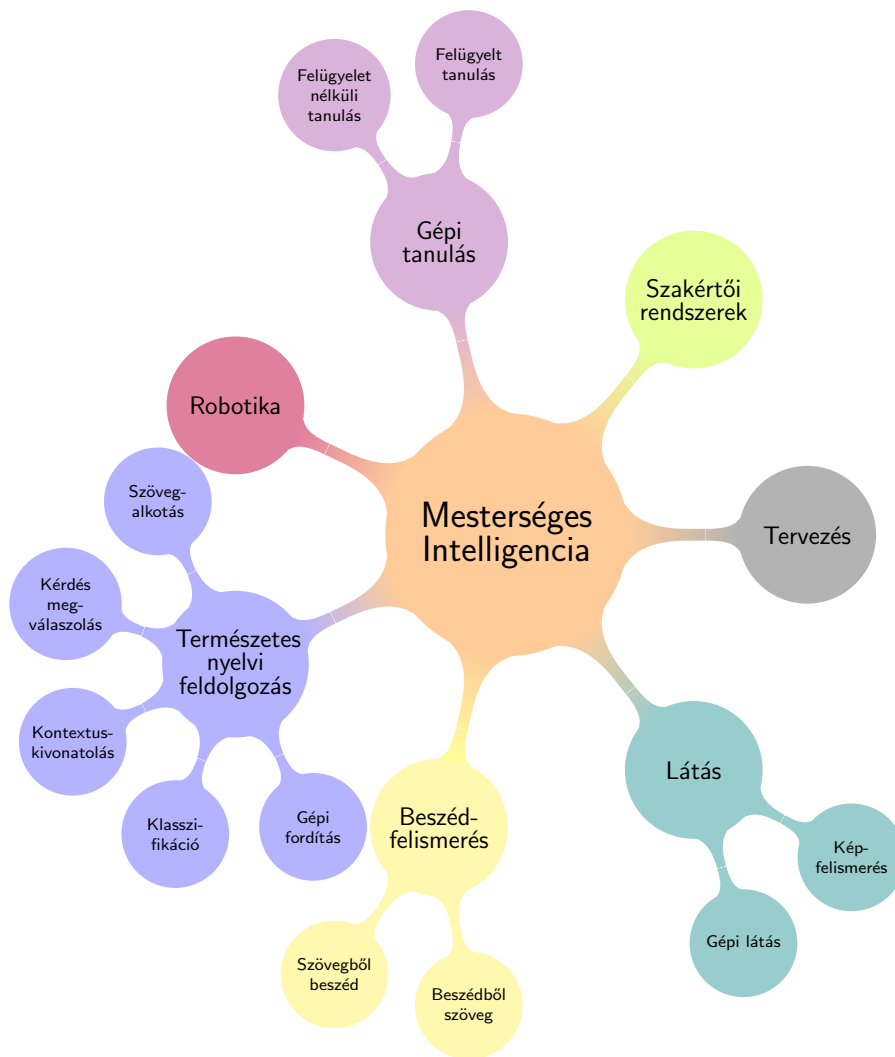
Napjainkban gyakran találkozunk a mesterséges intelligencia egyértelmű (pl.: chatGPT, önvezető autók) és kevésbé egyértelmű (pl.: okostelefonunk háttér alkalmazásai) jelenlétével az élet számtalan területén (Helm és mtsai. 2020). Azonban annak ellenére, hogy jelen van mind a hétköznapi, mind a szakmai életünkben, már a definiálása is nehézséget okoz. Az első, ma már általánosan AI-ként elismert munka megjelenése óta több meghatározása is született, melyek az idők során változnak és párhuzamosan léteznek (Russell, 2010). Általánosságban a mesterséges intelligencia kifejezést akkor használjuk, amikor egy gép olyan feladatot végez el amihez - az emberhez hasonlóan - problémamegoldó képességgel (pl.: tanulás, mintázatfelismerés) kell rendelkeznie (Jakhar, Kaur, 2020; Pesapane és mtsai. 2018). Az AI a számítástechnikának olyan szerteágazó területe, mely megoldást tud nyújtani komplex problémákra számtalan tudományterületen (4.1. ábra). A továbbiakban a mesterséges intelligencia alkalmazási területei közül a gépi tanulással foglalkozom, különös tekintettel a mesterséges neurális hálózatokra.

4.1.1.2. Gépi tanulás a mesterséges intelligencián belül

A gépi tanulás a mesterséges intelligencia azon területe, mely olyan algoritmusokkal foglalkozik, amelyek képesek mintázatok felismerésére (Greener és mtsai. 2022). Ezek olyan algoritmusok, melyek korábbi „tapasztalatok” felhasználásával alkalmassá válnak egy adott feladat megoldására (Benos és mtsai. 2021), anélkül, hogy direkt módon a probléma megoldására lennének programozva (Bi és mtsai. 2019; Sarker, 2021). Összegyűjtött adatok felhasználásával, „tanítás” után számunkra fontos információt automatizáltan prediktálnak (Benos és mtsai. 2021; Slob és mtsai. 2021). A gépi tanulás legígéretesebb ága a mély tanulás (Pesapane és mtsai. 2018)(4.2. ábra), melyről a későbbiekben lesz szó.

4.1.1.3. Gépi tanulási alapfogalmak

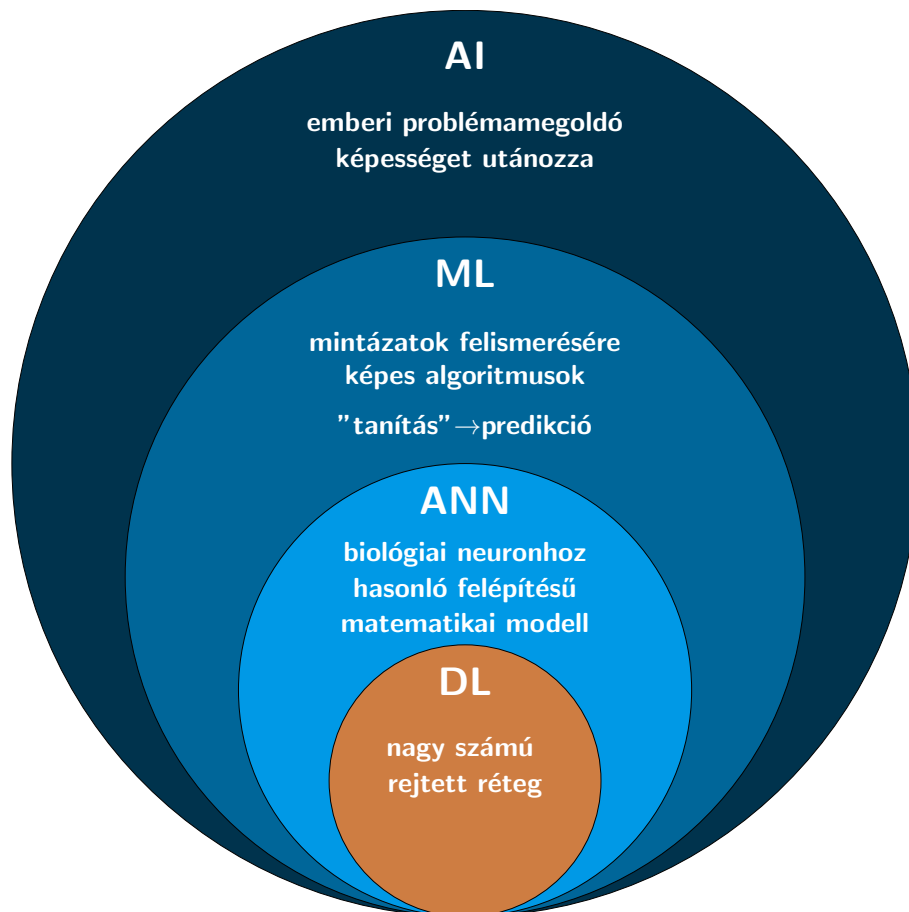
Ebben az alfejezetben tárgyalom azokat a számítástechnikai alapfogalmakat, melyek nélkülözhetetlenek a gépi tanulás megértéséhez. A téma szerteágazó mivolta miatt csak a legszükségesebb fogalmakra szorítok.



4.1. ábra. A mesterséges intelligencia főbb területei

Adathalmaz: A gépi tanulás hatékonyságát leginkább befolyásoló tényező a rendelkezésre álló adathalmaz (Sarker, 2021). Adathalmaz alatt a vizsgálatunk tárgyát képező adatpontok összességét értjük. Ezen adatpontok több, meghatározott számú tulajdonsággal (*feature*) bírnak, ezek az ún. *független változók*. Például egy szubklinikai tőgygyulladás kimutatni képes rendszer esetén az adatbázisunk olyan adatpontokat tartalmaz, melyek tulajdonságai a következők lehetnek: tej elektromos vezetőképessége, leadott tej mennyisége, tej vértartalma, stb. Ezek lesznek a bemeneti értékek (*input*), melyet a gépi tanulás felhasznál a kimeneti értékekkel való kapcsolat kialakítására (*output*).

Tanulási módszerek: Ahhoz, hogy egy már megalkotott általános gépi tanulási modell az általunk megoldani kívánt feladatra adjon választ, „tanítani” kell. A tanítási módszerek alapvetően két csoportba oszthatók felügyelt (*supervised*) és nem felügyelt (*unsupervised*) (Greener és mtsai. 2022; Liakos és mtsai. 2018). Az előbbi esetén a tanítás során az algoritmus input-output párokat használ fel az összefüggés becslésére (Sarker, 2021). Az input-output párokat alapigazságnak tekintjük, ez az ún. *ground truth*. Ezt általában mérésekkel vagy valamilyen egyéb módszerrel emberek hozzák létre (Greener és mtsai. 2022). Például egy tejelő tehének testkondícióját becslő algoritmus esetén a szakértő által értékelt és felcímkézett képek jelentik

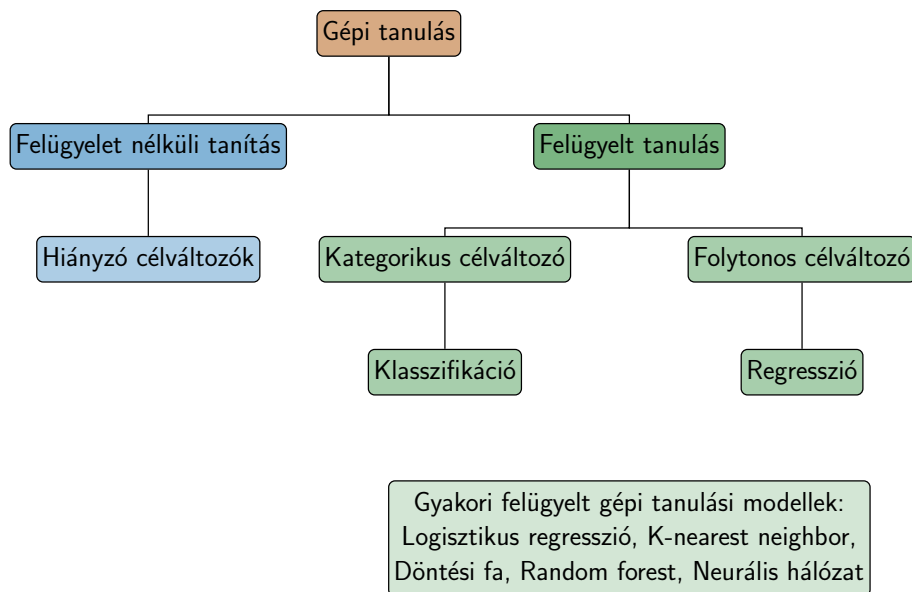


4.2. ábra. A mély tanulás (DL), a mesterséges neurális hálózatok (ANN), a gépi tanulás (ML) és a mesterséges intelligencia (AI) viszonyrendszere és főbb jellemzőik

a ground truth adathalmazt (Nagy és mtsai. 2023c). Ezzel szemben a nem felügyelt tanítás nem igényel felcímkézett input-output adatpárokat. Adatvezérelt módon elemzi az adathalmazokat jobbra általános jellemzők, trendek és adat struktúrák azonosításának céljából (Greener és mtsai. 2022; Sarker, 2021). Létezik a két módszer keveréke is az ún. *semi-supervised learning*. Ez a felcímkézett adatok hiánya esetén jelenthet segítséget (Greener és mtsai. 2022; Sarker, 2021). A megerősítéses tanulás (*reinforcement learning*) ezzel szemben a próba-hiba módszerét alkalmazva próbálja megtalálni az adott környezetben a lehető legjobb műveletet (Benos és mtsai. 2021). Ezt a modell típust leginkább az automatizáció, robotika, vagy autonóm vezetés területén használják (Cockburn, 2020; Sarker, 2021).

Feladattípusok: A gépi tanulási módszereket csoportosíthatjuk aszerint is, hogy milyen feladattípust kívánunk vele elvégezni (4.3. ábra). Alapvetően a klasszifikáció, regresszióelemzés, adatok klaszterezése, asszociációs szabályok tanulása, dimenziócsökkentés, valamint mély tanulási módszerek csoportjairól beszélhetünk (Sarker, 2021).

Munkánk során elsősorban klasszifikációs és objektum detekciós feladatokkal foglalkoztam, ezért ezekre térek ki bővebben. A klasszifikáció és objektum detekció a két leggyakoribb művelet, amit képekkel végzünk ML segítségével. Klasszifikáció alkalmával az ML prediktálja egy adott objektum létezését a képen, míg objektum detekció esetén lokalizálja azt (Z. Song és mtsai. 2011).



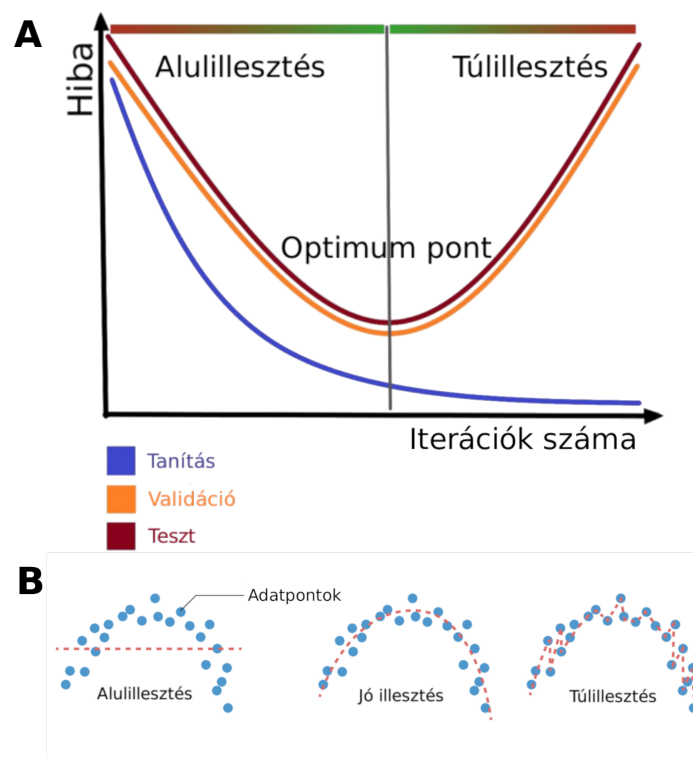
4.3. ábra. Gépi tanulási módszerek csoportosítása.

Loss-függvény: Mivel az ML a tanulás során tapasztalati úton keresi a legjobb megoldást, szükségünk van egy mérőszámra, ami alapján az összefüggések helyessége ellenőrizhető. Erre a Loss-függvény kínál megoldást. Felügyelt tanulás esetén a modell prediktált outputjai és a ground truth közötti eltérést mérjük a Loss-függvénnyel (Greener és mtsai. 2022).

Túlillesztés és alulillesztés: A gépi tanulási modelltől azt várjuk el, hogy a rendelkezésre álló adatokból valós összefüggéseket tárjon fel számunkra, melyek általánosíthatók, és a modell által nem ismert adatokon is alkalmazhatók (Greener és mtsai. 2022). Túlillesztés esetén a modell „memorizálja” a tanuló adathalmaz sajátosságait (Wagner és mtsai. 2021), így tökéletesen működik azon az adathalmazon (Greener és mtsai. 2022). Azonban ismeretlen adatokon (teszt-, validációs halmaz) rosszul teljesít. Ezzel szemben az alulillesztés alatt azt értjük, amikor a modell a tanuló adatbázis mintázatait sem képes feltérképezni a „tanítás” rövidege vagy a rossz modellválasztás miatt (4.4. ábra) (Greener és mtsai. 2022).

Transfer learning: Ahhoz, hogy egy neurális hálót teljes egészében magunk építsünk fel nagy mennyiségű, jó minőségű annotált adatra (gépi látás esetén akár több millió képre), és jelentős számítási kapacitásra van szükség, ami a legritkább esetben áll rendelkezésre. Ezért az ember tanulási képességéhez hasonlóan az ML modellek (azon belül is főleg a neurális hálózatok) sem a legelejéről tanulnak meg egy problémát megoldani, hanem a korábbi „tapasztalataikat” felhasználva. Az ún. *transfer learning* két részből áll, az előtanításból (*pre-training*), ami néhány kezdeti feladattól szerez alaptudást, és a finomhangolásból (*fine-tuning*), ami a megszerzett tudás aktuális feladathoz való adaptálását jelenti. Így csökkenthető a modell tanításához szükséges tanítási idő és adatmennyiség adott problémára vonatkozóan (Han és mtsai. 2021). A munkámban a testkondíció pontozáshoz használt R-CNN modelleket (ld. később) az ImageNet több millió képet tartalmazó adathalmazán tanították (Girshick és mtsai. 2015). Az így előtanított hálózatokat aztán átültettük a célfeladatra felügyelt finomhangolással.

Paraméter és hiperparaméter: A paraméter (*súly*) olyan változót jelöl, amit a modell automatikusan változtat. Ezzel szemben a hiperparamétereket mi adjuk meg manuálisan a tanítás előtt (Do és mtsai. 2020).



4.4. ábra. Az illesztés minősége. Az A ábra részen a modell predikciójának hibáját láthatjuk az iterációk számához viszonyítva Wagner és mtsai. (2021) munkája alapján A B ábra részlet azt mutatja be, hogy hogyan tud illeszkedni a modell a vizsgált adatokra. Alulillesztésnél a modell nem képes változók közötti alapvető kapcsolatot felderíteni, míg túlillesztés esetén a modell a tanító adathalmazban tapasztalható zajt is megtanulja (Greener és mtsai. 2022)

Batch, epoch, iteráció: Az adathalmazunkat (általában) egyenlő mintaelemszámú batchekre osztjuk. A tanuló modell minden egyes batchen való végighaladás után felülírja a belső paramétereit. Amikor végig halad az összes batchen, az azt jelenti, hogy a tanító halmaz minden eleme hatással lehetett a modell belső paramétereire. Ezt nevezzük epochnak. Az epoch és a batch is hiperparaméter, tehát ezek értékét mi szabjuk meg. Általában több epoch alatt tanítjuk a modelljeinket, tehát egy tanuló modell több alkalommal is végig halad a tanító halmazon. A batchek méretét az adathalmazunk mintaelemszáma, a modell súlyainak száma és a rendelkezésre álló számítási kapacitás befolyásolhatja. Az egy epoch elvégzéséhez szükséges batchek száma adja az iterációt (Do és mtsai. 2020).

4.1.2. Gépi tanulási módszerek

Ebben a fejezetben áttekintjük az agráriumban gyakran előforduló gépi tanulási modelleket, kezdve a hagyományos ML modellektől (nem neurális hálózatok) a mesterséges neurális hálózatokig.

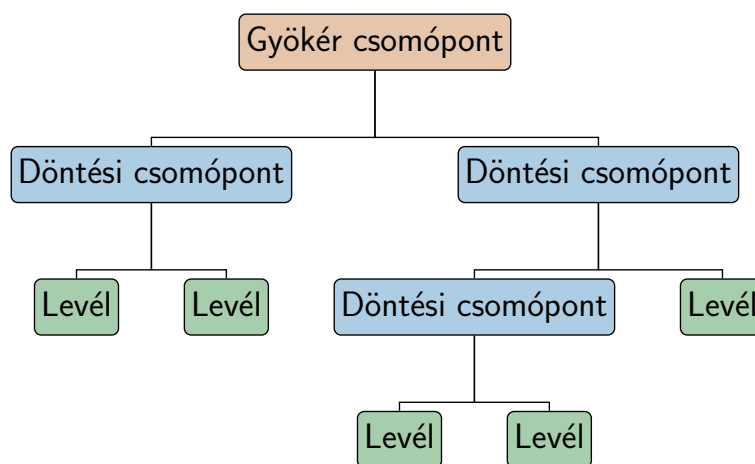
4.1.2.1. Hagományos gépi tanulási modellek

Az ANN-en kívül a leggyakrabban használt modelleket és főbb tulajdonságaikat a 4.1. táblázatban foglalom össze. Továbbá ebben a fejezetben azokat a hagyományos gépi tanulási modelleket ismertetem melyeket a munkám során használtam.

4.1. táblázat. Gyakori hagyományos gépi tanulási modellek (Sarker, 2021)

Modell	Leírás	Előny	Hátrány
Logisztikus regresszió	bináris esemény predikciójára alkalmas	egyszerű, kis számítási igény	lineáris összefüggés kell a változók között
K-nearest neighbors	hasonlóság mértéke alapján osztályoz	egyszerű, kis számítási igény, nem túl adatintenzív	érzékeny a felesleges feature-ökre, zajra
Döntési fa	az input tulajdonságainak ellenőrzésével jutunk el az outputhoz	könnyű interpretálni, numerikus és kategorikus adatot is kezel, kevés adatelőkészítést igényel	túlillesztés esélye magas
Random forest	több párhuzamos döntési fa együttes alkalmazása	túlillesztés esélye csekély, finomhangolási igénye kisebb	rossz értelmezhetőség

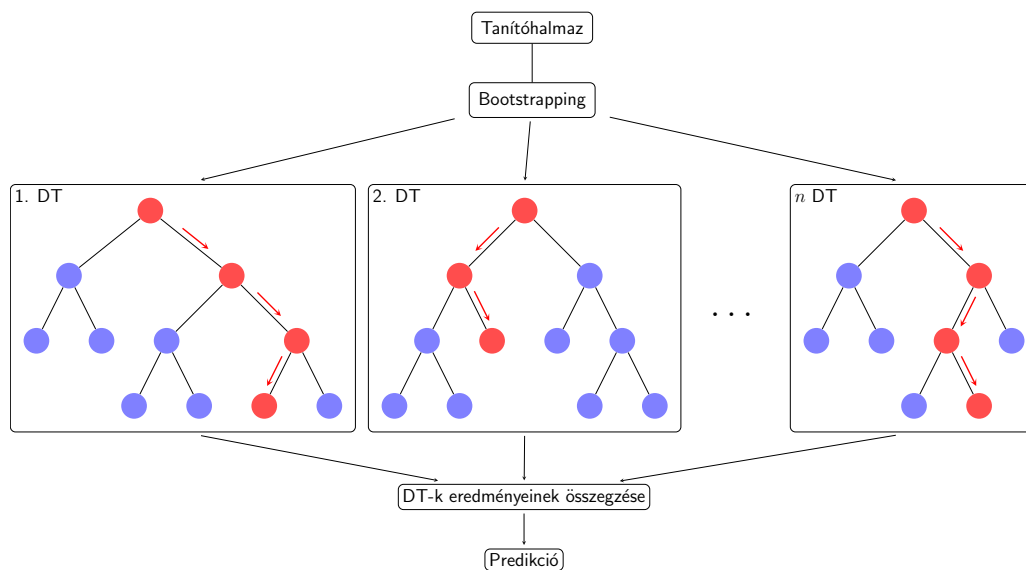
A virális eredetű genom szekvenciák azonosításához használt VirSorter2 random forestet (RF) alkalmaz a működése során. Mivel a random forest modellek decision tree (DT) típusú modellek összességéből állnak, ezek tulajdonságainak részletezésére is kitérek.



4.5. ábra. A decision tree általános felépítése.

A decision tree, magyarul döntési fa olyan modellek összessége, amelyek eldöntendő kérdések hierarchikus sorrendjével sorolja osztályba a kívánt adatokat (Kingsford, Salzberg, 2008). A DT modellek csomópontokból és azokat összekötő ágakból állnak (4.5. ábra). Egy gyökércsomópontból kiinduló ágakon haladva a belső-, más néven döntési csomópontokon keresztül a levél-azaz végcsomópontokhoz jutunk (Carracedo-Reboredo és mtsai. 2021). A vizsgált elem osztályba sorolásakor a legfelső elemtől, a gyökércsomóponttól kiindulva végig haladunk a döntési csomópontok egy útvonalán, melynek végén egy végponthoz jutunk, ami egyben az elem osztályát is jelenti. A modell építése során a felcímkézett adatokat használva olyan kérdéseket adunk a DT-hez, ami a lehető legjobban klasszifikálja az adatainkat. A legkézenfekvőbb az lenne, ha egy kérdéssel homogén osztályokra tudnánk bontani a heterogén adathalmazunkat, azonban ez szinte soha sincs így. Ezért olyan döntési csomópontokat adunk a modellünkhöz, ami a lehető legtisztábban választja szét az adatainkat (Kingsford, Salzberg, 2008). Ezzel szemben az RF modellek esetében a csomópontok hierarchiáját véletlenszerűen meghatároz-

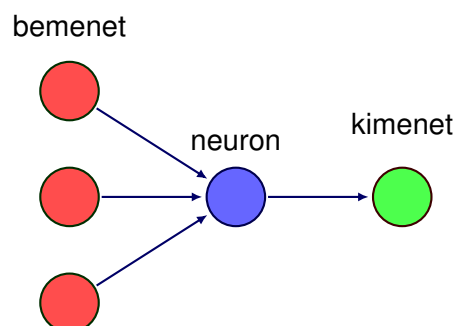
va hozunk létre nagy számú, egymástól független DT modellt (Doupe és mtsai. 2019). Az RF belső DT modelljei nem a teljes adathalmazt vizsgálják meg, egy ún. *bootstrapping* módszerrel kisebb halmazokat hozunk létre számukra. A *bootstrapping* lényegében egy visszatevéses mintavételi technika, melynek lényege, hogy a kiindulási adathalmazunk elemeit véletlenszerűen válogatjuk bele kisebb részhalmazokba úgy, hogy egy elem akár többször is szerepelhet az adott részhalmazban. Az RF-et alkotó döntési fák a már ismertetett módon jutnak el a predikcióhoz a számukra biztosított részhalmazok adatait használva (4.6. ábra). A belső DT-k a különböző felépítésük miatt más és más aspektusát vizsgálják a figyelembe vett információknak (Carracedo-Reboredo és mtsai. 2021). A DT-k predikcióit összegezve jutunk el az RF végső predikciójához (Doupe és mtsai. 2019).



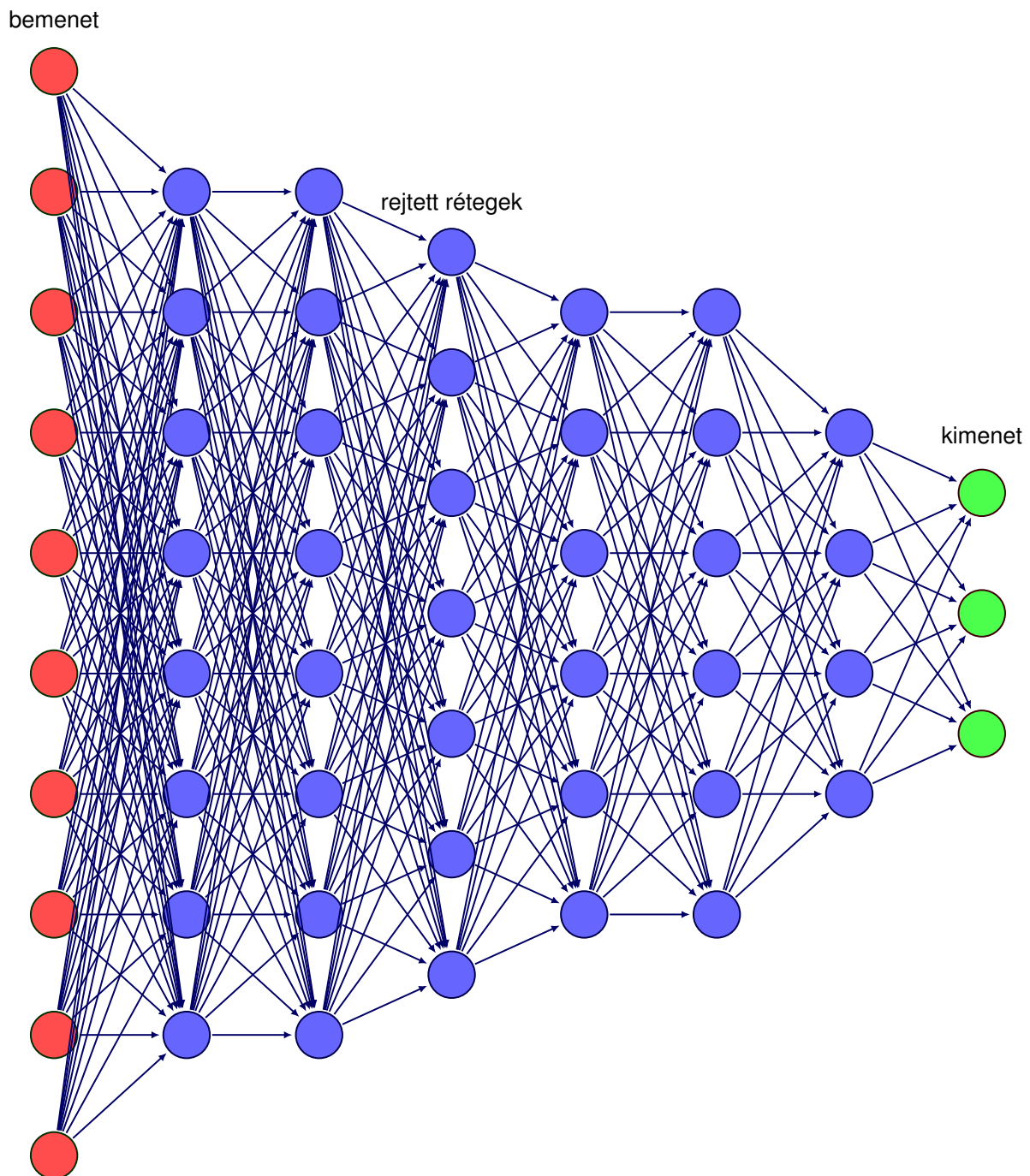
4.6. ábra. A random forest általános felépítése.

4.1.2.2. Mesterséges neurális hálózatok

Az első ANN-ek fejlesztésének, alkalmazásának alapötletét az idegsejtek információfeldolgozási, -továbbítási modellje adta (Kleene, 1956; McCulloch, Pitts, 1943).



4.7. ábra. Egy neuron információátadási sémája. Ha az idegsejtbe érkező bemeneti jelek összegződésének eredménye meghalad egy adott határértéket, akkor kimeneti jel képződik. Ha nem haladja meg a határértéket, akkor elnyelődik, nem jut tovább a jel.



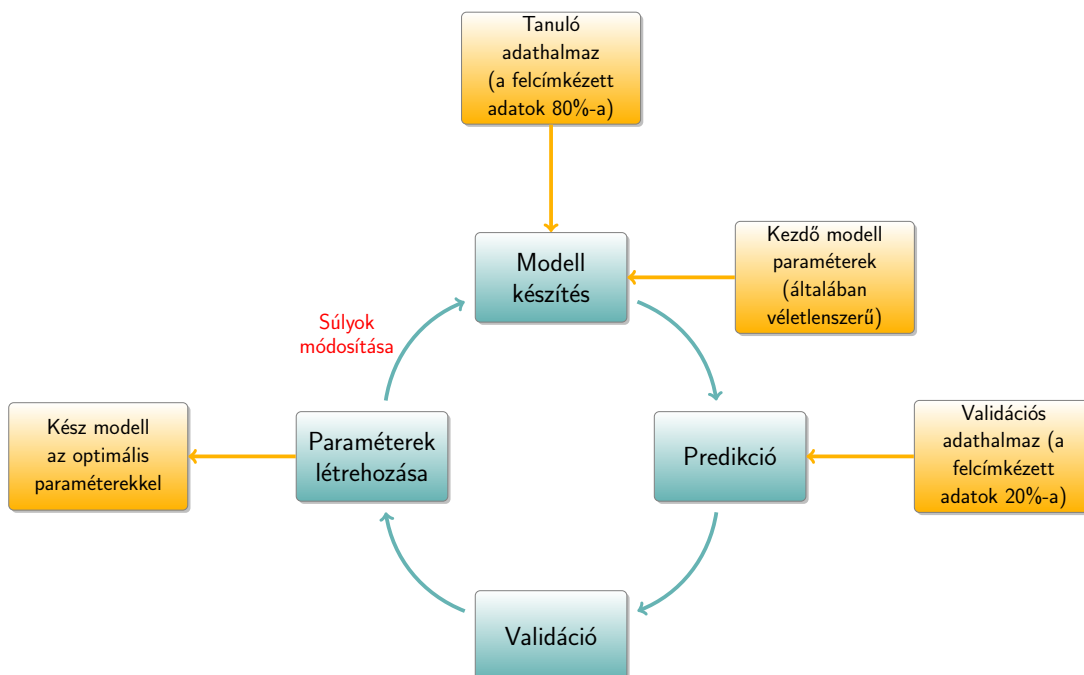
4.8. ábra. Mély neurális hálózat. A bemeneti és kimeneti rétegek között, rejtett rétegekbe rendezetten nagy számú neuron helyezkedik el. A hálózat teljesen összekötött, mivel minden réteg minden eleme minden szomszédos réteg összes elemével kapcsolatban áll. A rejtett rétegek, illetve a bemeneti és kimeneti rétegek elemeinek száma a modellezési feladatnak megfelelően változik.

Ezek olyan matematikai modellek, melyek az agy felépítéséhez hasonló szerkezettel bírnak (Greener és mtsai. 2022). Az agyhoz hasonlóan a neurális hálók működését biztosító alapegységek a neuronok. Amely legegyszerűbb sémája az, hogy egy idegsejtbe jelek érkeznek és azokat a sejt valamilyen szabályrendszer alapján továbbítja vagy sem egy másik idegsejt felé (4.7. ábra) (Nayeri és mtsai. 2019). Ez egy mesterséges neuron estében azt jelenti, hogy a ne-

uronban a súlyozott bemeneti értékek összegződnek, és egy nemlineáris aktiválási függvényen futnak keresztül (Chartrand és mtsai. 2017). A gépi tanulásban alkalmazott neurális hálózatok ebből az egyszerű alaptól kiindulva egy, de inkább több rétegbe rendezett nagy számú neuronból állnak (4.8. ábra), az agyban található szinapszisokhoz hasonló módon. Az egyik réteg neuronjainak outputjai lesznek a következő réteg inputjai (Greener és mtsai. 2022). Az ANN-ekre jellemző, hogy több ezer neuronból állnak, nagyon összetett nemlineáris függvényeket tudnak reprezentálni (Chartrand és mtsai. 2017). A nagyszámú neuronrétegből álló hálózatokat mély hálózatoknak is nevezzük, az ezekre épülő gépi tanulást pedig mély tanulásnak. Az első, ún. *bementi réteg* tartalmazza a modellben használt független változókat (feature). Az utolsó réteg, a *kimeneti réteg*, a modell predikcióiból áll. A mély hálózatokban a bementi réteg és a kimeneti réteg között számos köztes, azaz *rejtett réteg* található (Chartrand és mtsai. 2017). Ezekben a rétegekben zajló számításoknak az eredménye az, ami hozzásegíti a modellt a végső predikcióhoz (4.8. ábra).

4.1.2.3. Egy felügyelt, klasszifikációs ANN modell létrehozása

Mivel a munkámban használt legtöbb ML modell az ANN-ek körébe tartozik, a továbbiakban ezzel foglalkozom részletesebben. Az ANN tanításának folyamatát a 4.9. ábra mutatja be.



4.9. ábra. A gépi tanulás folyamatának sémája. A tanuló adathalmazon az algoritmus a hálózat neuronjainak kezdeti paramétereit (súlyok) iteratív módon úgy változtatja, hogy a kézi annotáció és a predikció eltérését minimalizálja. Meghatározott számú iterációnként a validációs halmazon is predikciót végzünk, aminek eredményét szintén összevetjük az kézi annotációval.

Badillo és mtsai. (2020), Benos és mtsai. (2021), Chartrand és mtsai. (2017), Goodswen és mtsai. (2021), Greener és mtsai. (2022), Maleki és mtsai. (2020) és Ripley (2007) munkái alapján a következő lépésekben foglalható össze a folyamat:

1. Olyan adathalmazt kell létrehozni, amely kellően nagy mennyiségű, változatos, felcímkezett adatból áll (Goodswen és mtsai. 2021). Minél nagyobb az adatok mennyisége és változatossága, annál jobb lesz a modell általánosíthatósága, azaz annál jobban teljesít a modell számára addig ismeretlen adatokon is (Benos és mtsai. 2021; Goodswen és mtsai. 2021).
2. Az adatpontjaink megfelelő tulajdonságainak kiválasztása (*feature extraction*) elengedhetetlen a zaj csökkentése érdekében (Goodswen és mtsai. 2021). A *feature extraction* tulajdonképpen azt jelenti, hogy kiválasztjuk a számunkra lényeges független változókat, a vizsgálat szempontjából érdektelenekeket, pedig eltávolítjuk.
3. Az előkészített adatbázist két részre osztjuk véletlenszerűen: az adatok nagyobb része (pl.: 80%) alkotja a tanuló adathalmazt a maradék pedig a teszhalmazt (pl.: 20%) (Goodswen és mtsai. 2021). Ennek a lépésnek az a célja, hogy a teszhalmaz adatai semmiképpen ne lehessenek azonosak a tanuló halmaz adataival (Greener és mtsai. 2022). Esetenként három felé osztjuk az adatbázist: tanuló-, teszt- és validációs halmazra (80-10-10%) ld. később.
4. A következő lépés a megfelelő modell(ek) kiválasztása. Mivel nem létezik olyan modell, ami az összes többi felülmúlná minden probléma esetében, ezért a modellválasztásnál tekintettel kell lennünk a rendelkezésünkre álló adatok mennyiségére és minőségére valamint a vizsgálatunk céljára (Goodswen és mtsai. 2021). Például annotált adatok hiányában nem alkalmazhatunk csak felügyelt tanulásra képes modellt.
5. A kiválasztott modell(ek) tanítása: Az ANN modellek pontos mechanizmusa nehezen megérthető, ezért szoktak ezekre a modellekre sokszor egyfajta fekete dobozként (*black box*) tekinteni (Badillo és mtsai. 2020; Goodswen és mtsai. 2021; Greener és mtsai. 2022). A belső működésük részletes leírására ebben a munkában nem térek ki, csak egy általános leírást adok, mely segíti a módszer megértését. A gépi tanulási modellek tulajdonképpen közismert matematikai függvények jól strukturált összessége (Goodswen és mtsai. 2021), melyek egy input halmazból értelmes kimeneti értéke(ket) hoznak létre (Greener és mtsai. 2022). Ahhoz, hogy a modell „tanulni” tudjon, azaz minél jobban tudjon illeszkedni a függvény-rendszerünk az adatainkhoz (Goodswen és mtsai. 2021), számos paraméterre van szükség, melyek a tanulási folyamat során változásra képesek (Greener és mtsai. 2022). Ezen paraméterek száma neurális hálózatok esetén akár több millió is lehet (Chartrand és mtsai. 2017). Ahhoz, hogy a modellünk a legjobb teljesítményt nyújtsa ezeket a súlyokat folyamatosan változtatni kell a tanulás során (Greener és mtsai. 2022). Az iteratív ML lényege, hogy kezdetben véletlenszerűen választott paramétereket használunk, amiket a tanulás során úgy módosítunk, hogy egyre kisebb Loss-értékeket kapjunk (Chartrand és mtsai. 2017; Goodswen és mtsai. 2021). A paraméterek folyama-

tos módosítását addig végezzük, amíg a lehető legkisebb Loss-értéket kapjuk (Goodswen és mtsai. 2021).

6. A modell tesztelése: A szakirodalomban a validációs- és teszhalmaz valamint a modell validációja és tesztelése kifejezéseket sokszor megfeleltetik egymásnak. Validáció során a modell a belső paramétereit automatikusan optimalizálja, míg tesztelés során, már a finomhangolt modellünk működését értékeljük (Ripley, 2007). A validációs halmazon végzett predikciók eredménye, és a szakértői annotáció közötti különbség adja az ún. *predikciós hibát*, ami a modell osztályozási képességéről nyújt információt. Mivel a folyamat során minden egyes iterációval megváltoznak a paraméterek, meghatározott számú iterációnként eltárolják az ANN-hez tartozó összes paramétert és azt, hogy mekkora az eltérés a szakértői és a prediktált osztályok között. Így a tanítás befejeztével a legkisebb hibát adó paramétergyűjtemény lesz a munka eredménye, amely később felhasználható más adatokon. A tanulási hibával ellentétben a teszt hibát már a kész modell esetében határozzuk meg. A teszt hibát *általánosítási hibának* is nevezzük, hiszen ez mutatja meg, hogy a kész modellünk mennyire hatékony ismeretlen adatokon, azaz mennyire jó az általánosító-képessége. Az ML modellek értékelésére és validálására többféle megközelítés létezik. A legkézenfekvőbb megoldás az ún. visszatartásos ellenőrzés (*holdout validation*). Ennek az a lényege, hogy a rendelkezésre álló adatbázist véletlenszerűen három részre osztjuk: tanuló-, validációs- és teszhalmaz. Az egyes halmazok egymáshoz viszonyított aránya változó lehet: 70-80%, 15-20%, 15-20%. A visszatartásos ellenőrzés nagy adatbázisok esetében alkalmazható jól. Mivel számítási igénye kisebb, ezért elegendő adat esetén ezt használják. Azonban kisebb adatbázisok esetén túl sok adatot veszítünk el a tanuló adathalmazból azzal, hogy visszatartjuk azokat a validációs és teszhalmaz számára. Ilyen esetekben keresztellenőrzést (*cross-validation*) hajthatunk végre. K -szoros keresztellenőrzés esetén (*k-fold cross-validation*) a kiindulási adatbázisunkat véletlenszerűen k darab egyenlő adatpontot tartalmazó csoportra osztjuk (leggyakrabban 10 vagy 5 csoportot szoktak használni). Iterációnként az ellenőrzést mindig egyetlen csoport segítségével végezzük. Így a tanítást $k - 1$ csoporton hajtjuk végre. A folyamatot k -szor hajtjuk végre. Ennek a módszernek a számítási igénye nagyobb, hiszen minden csoport egyszer validációs halmaz kell, hogy legyen. Abban az esetben, ha az adatbázisunkban kiegyensúlyozatlan az osztályok mintázata, a k -szoros keresztellenőrzés hibás eredményre vezethet. Ennek elkerülése érdekében a k számú csoportokat úgy alakítjuk ki, hogy az egyes csoportokban a minták osztályeloszlása megfeleljen az adatbázisban tapasztalhatónak. Ezt nevezzük rétegzett k -szoros keresztellenőrzésnek (*stratified k-fold cross-validation*) (Maleki és mtsai. 2020).

4.1.3. A gépi tanulási modellek értékelése

Az ML megközelítés sem garantálhatja a valóságot teljes biztonsággal leíró modelleket, a hibákat vizsgálni kell, a teljesítményük értékelése elengedhetetlen lépése a használatuknak (Nayeri és mtsai. 2019). Éppen ezért nagyon fontos, hogy milyen méréseket választunk a modelljeink értékelésére (Benos és mtsai. 2021). Ebben a részben néhány értékelési módszer található. A

legtöbb esetben a kontingenciatáblázat elemeit (4.2. táblázat) felhasználva tudjuk megbecsülni a modellek jóságát (Nayeri és mtsai. 2019).

4.2. táblázat. A két osztály esetén végzett klasszifikációs vizsgálatok 2×2 kontingencia táblázatának cellaértékei.

Fogalom	Definíció	Rövidítés
Valódi pozitív	a feltétel meglétét a modell helyesen prediktálja	TP
Valódi negatív	a feltétel hiányát a modell helyesen prediktálja	TN
Téves pozitív	a modell a feltétel meglétét prediktálja, holott a valóságban az hiányzik	FP
Téves negatív	a modell a feltétel hiányát prediktálja, holott a valóságban az jelen van	FN

A következőekben a kontingencia táblázat elemeiből kiszámítható legfontosabb értékelési mód-szereket definiálok és fejtem ki bővebben.

- A predikciós pontosság (*accuracy*) az egyik legszélesebb körben alkalmazott ML metrika. Azonban fontos tisztában lenni vele, hogy kiegyensúlyozatlan adatokon nem teljesít jól (Nayeri és mtsai. 2019). Számítása:

$$accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

- A precizitás vagy pozitív prediktív érték (positive prediction value vagy *precision*) a helyesen prediktált pozitív értékek aránya az összes megjósolt pozitív értékhez viszonyítva (Badillo és mtsai. 2020):

$$precision = \frac{TP}{TP + FP}$$

- A valódi pozitív értékek aránya (true positive rate, másnéven *recall*) az orvosbiológiai kutatásokban szenzitivitásként ismert mérőszám a helyesen pozitívnak prediktált értékek arányával egyezik meg (Nayeri és mtsai. 2019):

$$recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

- A specificitás, szelektivitás vagy a valódi negatívok aránya (true negative rate) mutatja meg a helyesen negatívnak prediktált értékek arányát (Nayeri és mtsai. 2019):

$$specificity = \frac{TN}{TN + FP}$$

- Az F1 score a pozitív predikciós érték és a szenzitivitás harmonikus átlaga (Nayeri és mtsai. 2019):

$$F1\ score = \frac{2TP}{2TP + FP + FN}$$

- A Matthews-féle korrelációs koefficiens (MCC) általában bináris klasszifikáció esetén használt mérőszám, amely kifejezetten jól alkalmazható kiegyensúlyozatlan adathalmaz

$$IoU = \frac{\text{metszet}}{\text{unió}} = \frac{\text{metszet}}{\text{unió}}$$

4.10. ábra. Intersection over Union (IoU), vagy más néven Jaccard-index.

esetén. Az értéke -1 és $+1$ közötti számot vehet fel, ahol a $+1$ jelenti a tökéletes predikciót, a -1 pedig azt, hogy a prediktált és a megfigyelt értékek között nincs összefüggés (Nayeri és mtsai. 2019). Számítása:

$$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP) \times (TP + FN) \times (TN + FP) \times (TN + FN)}}$$

- Görbe alatti területen (area under the curve, AUC) általában ún. *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-görbe alatti területet értjük. A ROC görbe egy vizuális megközelítése a modell jóságának becslésére. A görbén a modell szenzitivitásának és specificitásának egyensúlyát ábrázoljuk. Minél nagyobb a görbe alatti terület, annál pontosabb a modell (Nayeri és mtsai. 2019).
- Az Intersection over Union (IoU), vagy más néven Jaccard-index (4.10. ábra), a legnépszerűbb metrika az objektum detekció értékelésére. A módszer két alakzat közötti azonoság összehasonlítására alkalmas (Rezatofighi és mtsai. 2019).
- Average Precision: a Precision-Recall görbe alatti terület. Az Average Precision objektumdetekciós modellek értékeléséhez használt módszer. Mivel objektumdetekció esetében nem csak az a feladat, hogy helyesen klasszifikálja a keresett objektumot, hanem meg is kell találnia azt a képen, így nem elég csak a klasszifikációs feladatok során alkalmazott metrikák használata (pl.: precision, recall). Az objektumdetekciós feladatok értékeléséhez szükségünk van a modell által prediktált osztály és helyeződés pontosságának értékelésére is, ehhez a Precision-Recall görbét használjuk. A precizitás (precision) azt mutatja meg, hogy a modellünk által pozitívnak értékelt elemek hány százaléka valódi pozitív. A szenzitivitásként is ismert recall azt mutatja, hogy a valójában pozitív esetek hány százalékát találta meg a modell. A két érték sok esetben hatással van egymásra. Növekvő precizitás mellett csökkenő szenzitivitást kapunk, ezért vizsgáljuk a két értéket egymáshoz viszonyítva. A két mérőszámot úgy ábrázoljuk a PR-görbén, hogy az x -tengelyen a recall az y -tengelyen pedig a precision értékeket tüntetjük fel. A görbe segítségével információt kapunk a modellünk által elérhető legjobb precision és recall értékekről. Az Average Precision érték pedig, a PR-görbe alatti területeként, számszerűsíti azt. Az AP a precizitáshoz és a szenzitivitáshoz hasonlóan szintén 0 és 1 között értéket vehet fel, és minél közelebb van az értéke az 1-hez, annál jobb.

- AP50, AP75, AP90: az Average Precision értékei 50, 75 és 90%-os Intersection over Union esetén.
- A Cohen-féle kappa szakértők közötti vagy egy szakértő ömagához viszonyított egyetértését számszerűsítő statisztika. Értéke -1 és $+1$ között változhat, ahol 0 jelenti a véletlenszerűségből várható egyezés mértékét, míg $+1$ a tökéletes egyezést. A számítása a következőképpen zajlik: Cohen-féle kappa = $(P_0 - P_e)/(1 - P_e)$, ahol P_0 a megfigyelt egyezés a ground truth és a prediktált osztályok között, P_e pedig a modell predikciója és az annotációs alapigazság közötti véletlen egyetértés valószínűsége.

Mivel a bemutatott mértékek két osztály esetén kalkulálhatók, ha ennél több osztályra vonatkozóan becsüljük a predikció minőségét, akkor az ún. „egy az összes ellen” (*one-versus-all*) megközelítést használjuk. Ez azt jelenti, hogy minden osztály esetén kiszámoljuk, hogy hány predikció esett az osztályba (ezek lesznek a TP és FP értékek), illetve hogy összesen hány esett a többi osztályba (TN és FN). Így mindegyik osztályra külön-külön becsülhetünk minőségi mértékeket. Előfordul, hogy az összes osztályra vonatkozóan megadják ezen minőségi metrikák átlagát is, mint teljes predikciós minőségi becslést (Nagy és mtsai. 2023a).

Folytonos változókon alkalmazott predikciók esetén a bemutatott osztályba sorolási minőségi mértékek helyett a megfigyelt és prediktált értékek különbségét felhasználva fejezzük ki a modell pontosságát. Ilyen, gyakrabban használt, mérték a *predikció átlagos abszolút hibája* (MSEP) vagy a *predikció átlagos négyzetes hibájának gyöke* (RMSEP). Minél kisebb az értékük, annál pontosabb a predikció.

4.1.4. Gépi tanulás a mezőgazdaságban

Benos és mtsai. (2021) tanulmányából kiderül, hogy a gépi tanulás alkalmazhatósága az agráriumot tekintve a növénytermesztésen belül a legkutatottabb (68%), ezt követi az állattenyésztés (12%), majd a víz-és talajgazdálkodás (10-10%). Az állattermék-előállításához kapcsolódó ML modellek használhatóságát vizsgáló tanulmányok aránya csökkenő sorrendben a következőképpen alakult: szarvasmarha (58,5%), juh és kecske (26,8%), sertés (14,6%), baromfi (4,9%) és juhászkutya (2,4%) (Benos és mtsai. 2021). Az állattartásban használatos gépi tanulási algoritmusokat két csoportba oszthatjuk: állatjóléti és termelékenység elemzések. Jelenleg a szakirodalomban az utóbbira vonatkozó találatok vannak túlsúlyban. A gépi tanulásnak számos válfaja létezik (pl.: regresszió, random forest, k-nearest neighbors), az ezekben használt modellek alkalmazhatósága is céltól függően változó. A megoldani kívánt feladat és a rendelkezésre álló adatbázis tulajdonságainak fényében lehet a megfelelő modelleket kiválasztani (Sarker, 2021). Benos és mtsai. (2021) irodalmi áttekintése alapján a gépi tanulási módszerek közül a mesterséges neurális hálózatok a leghatékonyabbak az agrártudományi kutatásokban.

4.2. A vizsgálatok során érintett témák szakirodalmi összefoglalása

Munkám során a élelmiszerlánc több pontját érintő kérdésekre és problémákra kerestem megoldásokat a gépi tanulás eszköztárát használva (1.1. ábra). A következő fejezetekben a megoldani kívánt problémák biológiai hátterét tekintem át.

4.2.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének a szilázsban

Az intenzív tejelő szarvasmarhatartásban a szilázs a takarmányozás alapvető összetevője. Egy átlagos tejelő tehén naponta 25-27 kg ilyen takarmányt fogyaszt el, elérve ezzel laktációnként 12 500 kg szilázs fogyasztást is akár (Driehuis és mtsai. 2008; Eastridge, 2006). A szilázst leggyakrabban kukoricából, fűfélékből vagy lucernából állítják elő anaerob módon, erjesztés útján. A szilázs készítése során sokféle erjesztő mikroorganizmus, köztük számtalan baktérium faj, szaporodik el a takarmányban (Dunière és mtsai. 2013).

Ha a folyamatban részt vevő baktériumok antimikrobiális rezisztencia-géneket tartalmaznak, akkor ezeknek a géneknek a mennyisége a szilázsban megnő a baktériumok számával párhuzamosan. Következésképpen a szilázs, mint tömegtakarmány folyamatosan elláthatja a gyomor-bél traktust ARG-eket hordozó baktériumokkal. Az emésztőrendszerbe kerülő baktériumok érintkezésbe kerülhetnek a gazdaszervezet mikrobiótájával, ami elősegíti a bakteriális gének (pl.: ARG-k) cseréjét horizontális géntranszfer (HGT) révén. A HGT három különböző folyamat eredményeként jöhet létre: konjugáció, transzdukción és transzformáció. A *transzformáció* kivételével – amely során egy baktérium bármilyen gént felvehet a környezetéből – a HGT útjai különleges, aktív átviteli folyamatokat igényelnek. *Konjugáció* során a sejtek közötti kapcsolat lehetőséget biztosít arra, hogy egy plazmid másolata átkerüljön a befogadó baktériumba (Cabezón és mtsai. 2015). A *transzdukción* esetén nincs szükség sejt-sejt kontaktus létrejöttére, mivel ebben az esetben a bakteriofágok a baktériumok közötti génszállítás csatornájaként működnek (Goh, 2016).

Az átvitelben részt vevő gének genetikai környezete jelentősen befolyásolja az utóbbi két HGT-folyamat hatékonyságát, vagyis a gének mobilitását. A szilázsban részt vevő ARG-k mobilitási jellemzőit a következők miatt érdemes figyelembe venni. Ha a szilázsból származó ARG-k az állat szervezetében lévő patogén baktériumokba kerülnek át, az antibiotikus kezelés hatékonysága csökkenhet a későbbi bakteriális megbetegedések esetén.

Ezenkívül a szilázsból származó baktériumok bélben történő kolonizációja esetén az ARG-eket hordozó baktériumok megjelenése és feldúsulása egyben környezetben való ARG-feldúsulást is jelent a bélsárürítés révén. Az antibiotikus kezelések csökkent hatékonysága gazdasági veszteséget eredményezhet, a megnövekedett környezeti ARG-szint pedig az antimikrobiális rezisztencia (AMR) terjedése révén további állategészségügyi és humán-egészségügyi következményekkel járhat. Korábbi publikációk bizonyítják, hogy az ARG-k száma az erjesztett tejtermékekben az erjesztő baktériumok szaporodása miatt megnőhet (Tóth és mtsai. 2020b). Továbbá kutatócsoportunk probiotikus baktériumokban is kimutatta ARG-k jelenlétét (Tóth és mtsai. 2021, 2023). Ezért tartottuk fontosnak a szilázsban való előfordulásuk vizsgálatát.

4.2.1.1. Plazmid-detekció

A plazmidok olyan extrakromoszomális, legtöbbször cirkuláris DNS szakaszok, amelyek önállóan képesek replikálódni és fenntartani magukat. A konjugatív plazmidok ún. *konjugatív pilussal* is rendelkeznek, ami horizontális átvitelt tesz lehetővé más sejtekbe. Gyakran tartalmaznak kiegészítő géneket, amelyek genetikai előnyt jelenthetnek a gazdasejt számára (Brockhurst, Harrison, 2022). Bár kevés génnel rendelkeznek, azokhoz gyorsan képesek új géneket szerezni, a meglévő génállományból veszíteni, vagy azon belül sorrendet módosítani (Aytan-Aktug és mtsai. 2022). A bakteriális evolúcióban játszott kulcs szerepük (Brockhurst, Harrison, 2022) miatt fontos a minél alaposabb ismeretük (Krawczyk és mtsai. 2018). Mivel a plazmidok *in vitro* vizsgálata számos akadályba ütközik (munka- és időigényes, nem tenyészthető mikroorganizmusok esetében nem lehetséges), a napjainkban alkalmazott detekciós módszerek szekvencia-alapú megközelítést használnak (Aytan-Aktug és mtsai. 2022). Ezen bioinformatikai eljárások alapját számtalan megközelítés adhatja: cirkuláris DNS kimutatása, ismert plazmid szekvenciák keresése adatbázisokban, genomi mintázaton (*szignatúrán*) alapuló módszerek (Krawczyk és mtsai. 2018). Az általunk használt PlasFlow egy olyan mély neurális hálót használ, mely ez utóbbira támaszkodik.

4.2.1.2. Bakteriofágokhoz kötöttség

A vírusok szintén befolyással bírnak az őket tartalmazó mikrobiomra. Nagy részük nem tenyészthető, ugyanakkor a viroszféra mérete és jelentősége miatt fontos, hogy metagenomanalízis során a vírusgenomok automatizált kimutatására támaszkodhassunk (J. Guo és mtsai. 2021). A bakteriofágok HGT-ben játszott szerepe miatt az ARG-k mobilitásának vizsgálata során kulcsfontosságú, hogy azonosítani tudjuk a virális eredetű kontigokat.

Munkánkban J. Guo és mtsai. (2021) által fejlesztett VirSorter2-t használtuk a mobilitási elemzéseinkben a bakteriofágokhoz kapcsolódó ARG-k kimutatásához. A VirSorter2 egy olyan gépi tanulást alkalmazó vírusazonosító eszköz, mely alulreprezentált víruscsoportok esetében is képes vírusszekvenciák azonosítására.

4.2.2. Tejelő tehenek kondíciópontozása

A szarvasmarhák testállapotának pontozása egy széles körben elterjedt, nem invazív, könnyen használható, de szubjektív és időigényes módszer az állat bőr alatti zsírraktárainak telítettségének becslésére (Edmonson és mtsai. 1989; Ferguson és mtsai. 1994). Az állat energiaellátottságára a különböző pontozási rendszerek az ágyék, medence és faroktő régiójának burkoltóságából következtetnek (Ferguson és mtsai. 1994). A testraktárak telítettségét számszerűsítik egy numerikus skála segítségével, ahol a sovány egyedek alacsony, a túlsúlyos egyedek pedig magas értékeket kapnak (J. Roche és mtsai. 2004). A zsír- és energiaraktárak telítettsége fontos útmutatást adhat a tejelő telepek managementjéhez. Számos tanulmány kimutatta, hogy a testkondíciópont elmozdulása az ideális értéktől a termelésben bekövetkező változásokkal jár (Bewley, Schutz, 2008). A túl magas vagy alacsony kondíció-pontszámok számos egészségügyi problémára vagy rossz managementre utalhatnak (Bewley, Schutz, 2008). A magas kondíció pontszám és a ketózis kockázata közötti összefüggés jól ismert (Bewley, Schutz, 2008;

Morrow, 1976). Továbbá más anyagcsere-problémákkal (pl.: zsírmájszindróma) (J. R. Roche és mtsai. 2013) vagy magzatburok-visszamaradással (Morrow, 1976) is összefüggésbe hozható. A túl alacsony kondíció pontszám sántasággal és csökkent tejtermeléssel járhat (Bewley, Schutz, 2008). Számos kóros folyamat korrelál a BCS csökkenésével (pl.: méhgyulladás, inaktív petefészek, oltógyomor helyzetváltozás vagy későbbi vemhesülés) (Bewley, Schutz, 2008). Mivel a megbetegedések gyakran a BCS változásaival (Bewley, Schutz, 2008) állnak szoros kapcsolatban, nem pedig egy adott kondíció pontszámmal, érthető, hogy a folyamatos és megbízható állományszintű kondíció pontozás alapvető segítséget jelenthetne a tejelő állományok managementjében (Albornoz és mtsai. 2022; Silva és mtsai. 2021; Tao és mtsai. 2022; Truman és mtsai. 2022; K. Zhao és mtsai. 2023). Ezt akadályozza az a tény, hogy a pontozáshoz képzett személyzetre van szükség (Ferguson és mtsai. 1994), és az állományszintű pontozás időigényes. Adott pontozó személy önmagához viszonyított és különböző pontozó személyek közötti egyetértés változékonysága kihívássá teszi a BCS-adatok felhasználását (Kristensen és mtsai. 2006). Mullins és mtsai. (2019) kimutatta, hogy a két szakértő BCS-értékei közötti egyezés mérsékelt, míg X. Song és mtsai. (2019) megállapították, hogy a különböző szakértők közötti és egy adott szakértő következetessége gyengének, illetve mérsékeltnek értékelhetők.

4.2.3. Tej szomatikus sejtszám-növekedése

A tőgygyulladás, azaz a tőgyszövet gyulladása (IMI), a leggyakoribb fertőző betegség a tejelő szarvasmarha ágazatban (Cobirka és mtsai. 2020; Ruegg, Pantoja, 2013). Gazdasági kártétele nem csak abban áll, hogy a tőgyszövet érintettsége miatt csökken a tejtermelés (Cobirka és mtsai. 2020; Ruegg, Pantoja, 2013), de emellett a gyógykezelésre, megelőzésre fordított munka és anyagi költség is jelentős. A tehenészetekben felhasznált antibiotikumok 60-70%-át tőgygyulladás megelőzése vagy gyógykezelése céljából alkalmazzák (Cobirka és mtsai. 2020). Az okozott jelentős gazdasági és állatjóléti problémákat (Ruegg, Pantoja, 2013; Silva és mtsai. 2021) figyelembe véve, fontos, hogy a tőgygyulladást minél hamarabb detektáljuk és kezelni tudjuk. Azonban a 15-40-szer gyakrabban előforduló szubklinikai tőgygyulladás (SM), a klinikai tőgygyulladással ellentétben, nem okoz szemmel látható tüneteket a tőgyön vagy a tejben, csak a tejtermelés csökkenése és a tej összes sejtszámának emelkedése tapasztalható (Cobirka és mtsai. 2020). Mivel klinikai tünet nincs, kiegészítő vizsgálatok szükségesek a diagnosztikájában. A bakteriológiai vizsgálat és a PCR a legjobb módszer az IMI diagnosztizálására, de ezek drágák és időigényesek (Bobbo és mtsai. 2021).

Mivel a tejben lévő sejtek számának növekedése a gyulladással kapcsolatos válasz indikátora, a leggyakrabban használt módszer IMI kimutatására és a tőgy egészségi állapotának felmérésére az összes sejt számának, az ún. szomatikus sejtszámnak (SCC) meghatározása tejben (Bobbo és mtsai. 2021; Schwarz és mtsai. 2019; Silva és mtsai. 2021; Y. Wang és mtsai. 2022). SM kimutatásakor <200 000 sejt/mL SCC-t tekintjük egészségesnek (Cobirka és mtsai. 2020), de Ruegg, Pantoja (2013) munkája alapján már 100 000 sejt/mL-nél tapasztalható tejsökkenés. Azonban a 400 000 sejt/mL SCC-t már egyértelműen IMI-nek tekintjük. Az SCC használatát korlátozza, hogy a tőgygyulladás jelenlétén kívül egyéb tényezők is befolyásolják (Ruegg, Pantoja, 2013), valamint, képzett személyzetet igényel és drága a kivitelezése (Y. Wang és mtsai. 2022). Léteznek olyan fejtőgépek, amelyek alkalmasak az automatikus SCC meghatározásra,

de nem elterjedtek (Silva és mtsai. 2021). Ezzel szemben a tej elektrokonduktivitását mérni képes fejőgépek sokkal gyakrabban előfordulnak a tehenészetekben (Silva és mtsai. 2021). A tej elektromos vezetőképességének megváltozása tőgygyulladás esetén szintén régóta ismert jelenség (Ferrero és mtsai. 2014; Janzekovic és mtsai. 2009), azonban a használata önmagában nem olyan megbízható (Silva és mtsai. 2021; Y. Wang és mtsai. 2022). A könnyen elérhető, indirekt tesztek közé tartozik még a California Mastitis Test (CMT) (Schalm, Noorlander, 1957), amely a tejben található fehérvérsejtek kicsapódásával nyújt hozzávetőleges információt az SCC mennyiségére vonatkozóan, tőgynegyed szinten (Gohary, McDougall, 2018). Előnye, hogy egyszerű, a tehen mellett elvégezhető, de állomány szinten nem gyakorlatias az alkalmazása, valamint gyenge szenzitivitással és specificitással rendelkezik (Gohary, McDougall, 2018), továbbá a kiértékelése szubjektív (Y. Wang és mtsai. 2022).

A fentiekből látszik, hogy szükség van egy megbízható, automatizálható detekciós módszerre, amivel időben diagnosztizálhatjuk az SM-et, hogy csökkenthessük az antibiotikum felhasználást, javíthassuk az állatjóléti paramétereiket, a gyógyulási esélyeket és a gazdaságossági mutatókat (Silva és mtsai. 2021; Y. Wang és mtsai. 2022). Több irodalmi adat is arra mutat rá, hogy különböző indirekt kimutatási módszerek kombinálásával jobb eredményeket lehetne elérni ezen a téren (Bobbo és mtsai. 2021; Gohary, McDougall, 2018).

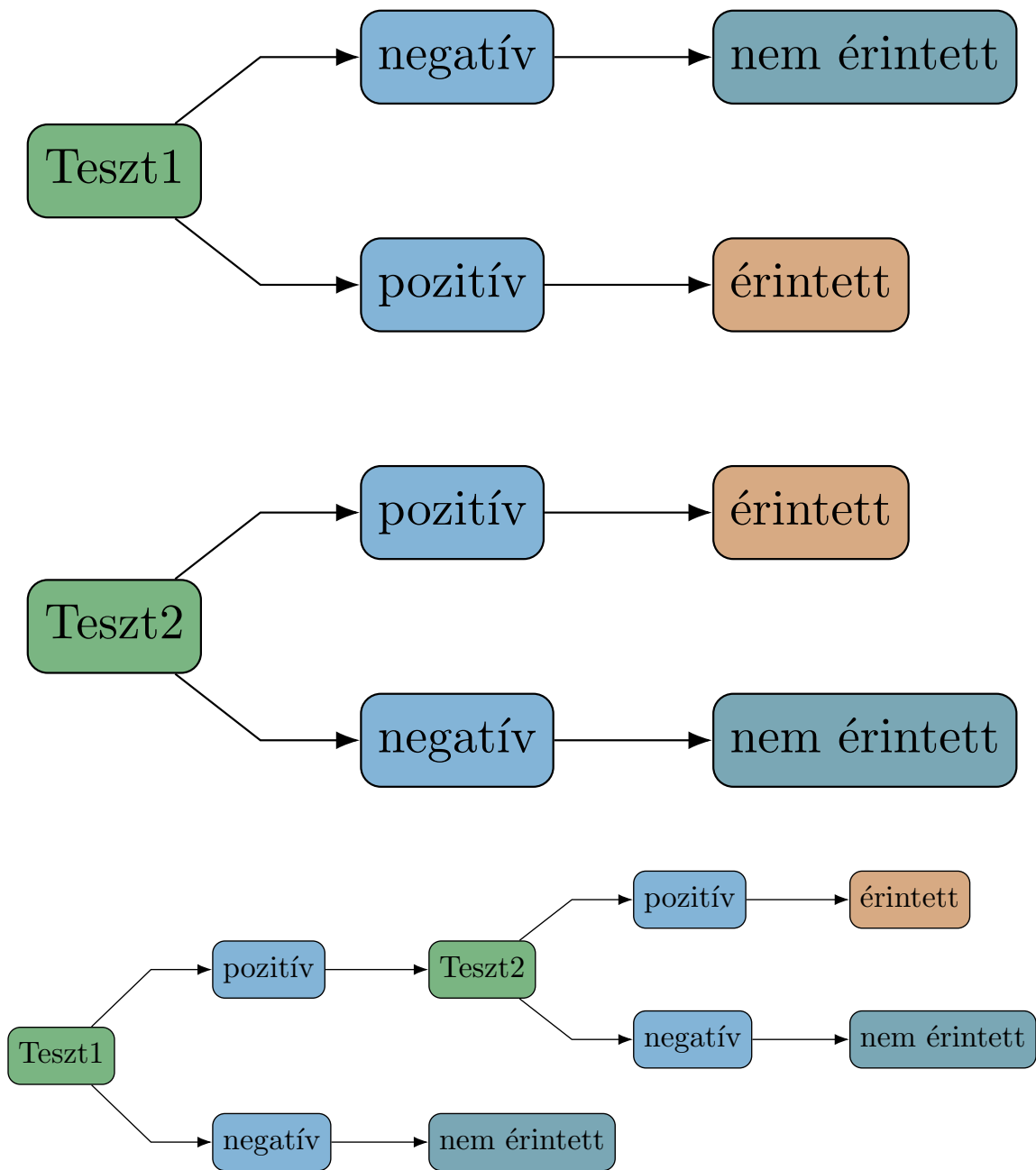
Munkánkban azt vizsgáltuk, hogy a tejelő tehenekre vonatkozó, automatikusan gyűjtött, laktációval-, a tej jellemzőivel kapcsolatos paraméterek és CMT kombinációjával hogyan javítható az SCC-növekedés predikciója. Ebből a célból mesterséges neurális hálózatokat tanítottunk be az elérhető, automatizáltan rögzített paraméterek felhasználásával az SCC-emelkedés klasszifikációjára. Majd az így létrehozott tesztet kombináltuk CMT-vel (Nagy és mtsai. 2023b).

A klinikai gyakorlatban több diagnosztikai teszt kombinációjával lehet javítani a tesztek prediktív értékeit. A tesztek kombinációjának két típusát különböztetjük meg: a párhuzamos és sorozatban történő tesztelést (4.3. ábra). A párhuzamos értelmezésben az állat pozitívnak tekintendő, ha az egyik teszt pozitív – ez növeli a kombinált tesztek szenzitivitását, de csökkenti a specificitását. Ez a párhuzamos tesztelési stratégia hasznos, amikor egyik teszt sem rendelkezik különösebben nagy szenzitivitással, de a betegség különböző típusait képesek detektálni (pl. korai – késői, gyorsan –lassan progrediáló). A sorozatesztelés során mindkét, egymást követő tesztnek pozitívnak kell lennie, hogy az állatot pozitívként azonosítsuk, ez növeli a specificitást, a szenzitivitás rovására. Az első teszt lehet magas szenzitivitású és olcsó, aminek eredményét egy magas specificitású teszttel tovább vizsgálhatjuk a fals pozitívok meghatározásának céljából. A költséghatékonyság miatt azokon az állatokon, amelyeknél az első teszt negatív volt, a második tesztet nem végzik el. Ez a stratégia lehetővé teszi az állatorvos számára, hogy kevesebb tesztet használjon a betegség kizárására, ugyanakkor időigényesebb. A két teszt pozitívítása után a betegség valószínűsége úgy számítható ki, hogy a második teszt esetén a pre-teszt valószínűség az első teszt alapján kapott pozitív prediktív értékkel lesz egyenlő (Cebul és mtsai. 1982).

4.2.4. Baktériumtelepek növekedési dinamikája

A baktériumok egyszerű kettéosztódással szaporodnak, amelynek sebességét alapvetően befolyásolják a környezet és a baktérium sajátosságai (Bochner, 2008). A baktériumszaporodás

4.3. táblázat. Több teszt kombinációjának lehetőségei. A felső két folyamatábra a párhuzamos, az alsó pedig sorozaban történő tesztelés logikáját mutatja be.



mértéke a klinikum számára fontos tulajdonságokkal hozható kapcsolatba. A fenotípus vizsgálata alapvető diagnosztikai eszköz a mikrobiológiai gyakorlatban (Bochner, 2008). Ezen vizsgálatok közé tartozik a bakteriális növekedési ráta meghatározása is, mely közvetett információval szolgál a baktérium patogenitási (Anderson és mtsai. 1979; Bourchookarn és mtsai. 2022; Fisher és mtsai. 2017) és élelmiszer-biztonsági tulajdonságairól.

Például a baktériumok növekedésének üteméből következtetéseket vonhatunk le az adott faj rezisztenciájára (Goelzer, Fromion, 2011) vonatkozóan. Az AMR megjelenése a genomban sokszor költséget jelent a baktérium számára, ezért a növekedési ráta csökkenéséhez ve-

zet (Andersson, Hughes, 2010). *Rickettsia* fajokban a gyors növekedésre képes tenyészeteket a szervezeten belüli jobb szóródási képességgel hozták összefüggésbe, míg a lassabb növekedésű baktériumok inkább az elhúzódó kórfejlődésben játszottak szerepet (Bourchookarn és mtsai. 2022).

Ehhez hasonló tulajdonságokkal bír a perziszter fenotípus. A perziszterek olyan lassú növekedésű vagy növekedésben megrekedt baktériumsejtek, amelyek antibiotikummal szembeni érzékenysége csekély az alacsony aktivitás vagy a csökkent antibiotikum-felvétel miatt. Összefüggésbe hozhatók a krónikus, visszatérő fertőzésekkel, és így a hosszantartó antibiotikus kezelések hatására az AMR terjedésének fontos sarokkövei lehetnek (Fisher és mtsai. 2017). Ezen túl természetesen az élelmiszer-higiéniában is fontos, hogy a baktériumok növekedési sebességéről információval rendelkezünk. Nem ritka, hogy a gyorsan növekvő, romlást okozó mikrobákat, lassú növekedésű populációk segítségével gátoljuk, annak érdekében, hogy egy termék eltarthatósági idejét meghosszabbítsuk (McMeekin és mtsai. 1997).

Ezért a baktériummennyiség időegység alatt való megnövekedésének (szaporodási rátájának) vizsgálata orvosi és állatorvosi szempontból fontos adatokat nyújthat. A szakirodalomban számos fejlesztés lelhető fel a szaporodási ráta automatizált követésére a különböző baktériumtenyésztési eljárásokhoz.

A folyékony táptalajon való tenyésztés során a folyadék zavarosságának (*turbidity*) kvantifikálását használják ebből a célból (Lindqvist, 2006). A baktériumok szaporodását nyomon lehet követni az elektromos vezetőképesség változásával önmagában vagy a zavarosság alakulásával kombináltan, illetve a redox-potenciál csökkenés mérésével (Madrid és mtsai. 1999). Szilárd táptalajon való tenyésztés során a baktériumtelepek méretváltozása alapján becslik a növekedési rátát.

A telepméret növekedésére leggyakrabban használt megoldásokban (Bär és mtsai. 2020; Barr és mtsai. 2016; Levin-Reisman és mtsai. 2014, 2010; Vulin és mtsai. 2018) közös, hogy a digitális képelemzés, amellyel a telepeket detektálják, majd lemérik méreteiket valamely küszöbérték alapú megközelítéssel nyugszik. Ehhez képest új irányt jelent a feladat megoldásához a *speckle imaging sub-pixel correlation analysis* (Balmages és mtsai. 2023), mely bonyolult és eszözigényes folyamat.

Ugyanakkor a baktériumtelepek neurális hálózattal történő detektálása is kézenfekvő megközelítést jelent (Majchrowska és mtsai. 2021; Pawłowski és mtsai. 2022). Azonban a baktériumtelepek detektálása, leszámllása során nem feltétlenül szükséges, hogy a telepeket azonosító *feature* (*bounding box*, határoló doboz) mérete pontosan illeszkedjen a telep méretéhez. Ezzel szemben, ha növekedési sebességet szeretnénk vizsgálni, akkor a lehető legpontosabban kell tudnunk mérni a detektált telepek méreteit, hiszen a határoló dobozok méreteit használva tudjuk a baktériumnövekedést mérni. Ez azt is jelenti, hogy a neurális hálózatoknak ilyen jellegű predikciós mértékei szerint szükséges a modellszelekciót is végeznünk, abból a célból, hogy a lehető legpontosabb eredményeket kapjuk.

Munkánk célja az volt, hogy saját annotációjú digitális képfelvételeken tanított CNN segítségével rekonstruáljuk Bär és mtsai. (2020) baktériumtelep-növekedési vizsgálati eredményeit, az általuk közreadott adatbázis felhasználásával (Nagy és mtsai. 2023d).

5. Anyag és módszer

5.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének vizsgálata

A vizsgálatunkhoz szükséges adatállományokat a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) adattárában kerestük. 2021 decemberében csak két olyan shotgun metagenomikai¹ projektet (PRJNA49541575, PRJNA764355) találtunk, amelyek megfelelő mélységgel rendelkeztek a vizsgálatunk alapjául szolgáló *de novo* assemblyhez².

Az NCBI SRA adatbázisában a mintákról korlátozottan állnak rendelkezésre a mintára vonatkozó leíró, metaadatok. Mindazonáltal a metaadatok alapján feltételezhető, hogy a PRJNA495415 mintáit a szilázs különböző erjedési időszakában vették. A 0., 7., 14. és 28. napon vett mintákat az A, B, C és D csoportba soroltuk. A PRJNA764355 minták metaadatai alapján ilyen rétegzés nem volt lehetséges, ezért az összes mintát az E csoportba soroltuk.

A nyers rövid readok³ minőség alapú szűrését és vágását a TrimGalore (v.0.6.6, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) segítségével végeztük, az alapértelmezett 20-as Phred minőségi pontszám beállítását használva. A Phred pontszám a bázisminőség mérésére szolgál a DNS-szekvenálásban. A 20-as pontszám tulajdonképpen azt jelenti, hogy 100 bázis közül 1 bázist azonosítottunk hibásan szekvenáláskor (99%-os megbízhatóság). Minél nagyobb ez az érték, annál pontosabb szekvenciákat használunk fel a munkánk során.

Csak az 50 bp-nál hosszabb readokat tartottuk meg, és a Kraken2 (v2.1.1) (Wood és mtsai. 2019) segítségével rendszertanilag osztályoztuk, amihez az NCBI RefSeq teljes archeális, bakteriális, vírusos és növényi genomokból létrehozott referencia adatbázisát (hozzáférés: 2021.03.24.) használtuk. A rendszertani besoroláshoz 0,5 konfidenciát használtuk, hogy pontosabb fajszintű találatokat kapjunk. Ez azt jelenti, hogy a taxonklasszifikáció során a Kraken2 a bemeneti szekvenciákat (nukleinsav esetén) 35 bázis hosszúságú kmerekre bontja. Ezeket a taxon adatbázisra illeszti *exact match-csel*. Minden kmerhez rendel egy taxont, így egy bemeneti szekvenciához több taxonunk lesz. A Kraken2 alapbeállításban az adott bemeneti szekvenciához azt a taxont társítja, amelyikhez a legtöbb kmer illeszkedett, ez a kmer paraméterezésénél a „confidence 0”. A 0,5-ös konfidencia azt jelenti, hogy az adott bemeneti szekvenciához azt a taxont rendeljük, amely a kmerek legalább feléhez lett társítva. Ez valójában egy nagyon szigorú feltétel. A szakirodalomban 0,1, 0,5, nagyon ritka esetben 0,9-es határértéket szokás használni a fals pozitív taxonklasszifikációk számának csökkentése érdekében.

A taxonba sorolási adatokat R programban (R Core Team, 2022) kezeltük a phyloseq (McMurdie, Holmes, 2013) és a microbiome (Lahti, Shetty, 2012-2019) csomagok függvényeinek segítségével. Az előfeldolgozott short readokat a MEGAHIT (v1.2.9) (D. Li és mtsai. 2015) segítségével alapértelmezett beállításokkal kontigokká⁴ állítottuk össze. A kontigokat a Kraken2 segítségével taxonómiailag besoroltuk, a fentiekkel megegyező adatbázissal.

¹metagenom: Adott mintában található organizmusok genomjának összessége (Krikó és mtsai. 2018).

²*de novo* assembly: egy olyan módszer, amellyel nagyszámú (rövid vagy hosszú) DNS-darabkából építjük fel a genomot, anélkül, hogy a fragmentumok helyes sorrendjét előzetesen ismernénk (Liao és mtsai. 2019)

³read: A szekvenálás során leolvasott kisebb DNS darabok digitális megfelelője (Krikó és mtsai. 2018).

⁴kontig: A readokból összeilleszthető genomrészletek (Ghurye és mtsai. 2016).

A kontigokból a Prodigal (v2.6.3) (Hyatt és mtsai. 2010) segítségével összegyűjtöttük az összes lehetséges *nyitott leolvasási keretet* (ORF)⁵. A lefordított fehérje ORF-eket a Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, v.3.1.3) (Jia és mtsai. 2017; McArthur és mtsai. 2013) ARG-szekvenciáihoz igazítottuk a Resistance Gene Identifier (RGI, v5.2.0) Diamond (Buchfink és mtsai. 2015) segítségével. A további elemzéshez kizárólag a CARD-adatbázissal tökéletes egyezést mutató ORF-eket tartottuk meg.

Az ARG-t tartalmazó kontigok integratív mobil genetikai elem (iMGE) tartalmát a MobileElementFinder (v1.0.3) és annak adatbázisa (v1.0.2) (Johansson és mtsai. 2021) segítségével elemeztük. A Johansson és mtsai. (2021) által az egyes baktériumfajok esetében alkalmazott távolságkonceptiót követve csak az iMGE-ken és ARG-ken belül meghatározott távolságküszöbértékkel rendelkező elemeket tekintettük társultnak.

A kontigok plazmid eredetének valószínűségét a PlasFlow (v.1.1) (Krawczyk és mtsai. 2018) segítségével becsültük meg. Az összeállított kontigok bakteriofág eredetét a VirSorter2 (v2.2.3) (J. Guo és mtsai. 2021) segítségével prediktáltuk. Az eredményeket a dsDNS-fágok és az ssDNS-ek szempontjából szűrtük. Minden adatkezelési eljárást, elemzést és ábrázolást R-környezetben (v4.1.0) végeztünk (R Core Team, 2022).

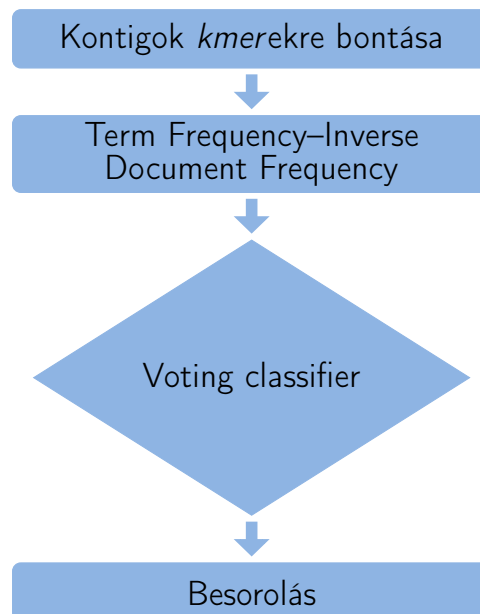
5.1.1. A PlasFlow működése

A PlasFlow (Krawczyk és mtsai. 2018) olyan algoritmusok összessége, melynek segítségével metagenom analízis során a kontigok plazmid szekvenciáinak detekciója lehetséges. A módszer neurális hálózatok használatára támaszkodik. Krawczyk és mtsai. (2018) módszerének lényegét az alábbiakban ismertetem.

A PlasFlow tanítása során teljes, kromoszomális baktérium-genomokat és többféle plazmid adatbázisból származó szekvenciákat használtak, melyekhez törzs-szintű (phylum) taxon-információkat is csatoltak. A kontigokon ún. *kmerek* előfordulási gyakoriságát vizsgálták. A kmer egy k elemszámú nukleotidból álló szekvencia. A tanítás során 3-7 nukleotidszámú kmeret használtak. Ez azt jelenti, hogy, ha a kmer 3 nukleotidból áll, összesen $4^3 = 64$ szekvencia-variánsunk lesz, 4 nukleotid esetén $4^4 = 256$, stb. A klasszifikáció során azt feltételezték, hogy az egyes genomiális elemek (kromoszóma, plazmid, fág, mitokondriális DNS) elkülönülnek a kmer-variánsaik gyakoriságában. Ezért meghatározták az egyes szekvencia-variánsok előfordulási gyakoriságát a tanító halmaz kontigjain, majd a nyers gyakorisági értékeket Term Frequency-Inverse Document Frequency (TF-IDF) módszerrel (Christian és mtsai. 2016) normalizálták. A TF-IDF egy a nyelvi feldolgozásban használt módszer, melynek lényege, hogy a súlyozza a szavakat azok előfordulási gyakorisága szerint. Vizsgálja a szó adott dokumentumban valamint adott dokumentumhalmazban való előfordulását. Az ezekre alapozott számítással kapott TF-IDF érték minél magasabb, annál meghatározóbb a szó az adott dokumentumban. Több ML modellt tanítottak be ezzel az adatbázissal. Jelen esetben a modell a kmer-eloszlás mintázatából következtet a genetikai elem eredetére. A klasszifikáció során egy ún. *voting classifier* segítségével javították a modell predikciós pontosságát. Mivel a tanító halmazban törzsre vonatkozó információk is szerepeltek, ezért a plazmid detekción túl alkalmazható taxonba so-

⁵nyitott leolvasási keret: A két stop kodon közötti DNS-szekvencia (Sieber és mtsai. 2018).

roláshoz is phylum-szinten. Az így elért 96%-os predikciós pontosság miatt a PlasFlow még mindig az egyik legjobb módszer a plazmid-detekcióra.



5.1. ábra. PlasFlow működésének egyszerűsített folyamatábrája.

5.1.2. A VirSorter2 működése

A J. Guo és mtsai. (2021) által fejlesztett VirSorter2 olyan vírusszekvencia-azonosító eszköz, mely gépi tanulási módszert használ a virális eredetű kontigok detektálásához metagenom mintákban. A működése a következőként írható le.

Először a bemeneti szekvenciák automatikus annotációja történik meg. Ehhez számos adatbázist használnak, ami lehetővé teszi, hogy a modell a lehető legszélesebb körből tudjon információt szerezni a predikcióhoz. Ezen felül az annotált adatokból az analízis szempontjából lényeges változókat is kiválogatja (feature extraction) a modell.

A feature extraction eredményét 5 különböző random forest modellel elemezzük. Az 5 különböző modell mindegyike a víruscsoportok egy-egy fő típusához társítható, melyek a következők: *Caudovirales* osztályba tartozó vírusfajok és hasonló dsDNS-fágok, *Nucleocytoviricota* törzsbe tartozó vírusok, RNS-vírusok, ssDNS-vírusok és *Lavidaviridae* családba tartozó virofágok. Ezen felül egy negatív kontroll adathalmazt is létrehoztak, mely baktériumok és archák, eukarióták (gombák és protozoák), valamint plazmidok szekvenciáit tartalmazta. A modelleket az NCBI RefSeq-ből származó referencia vírusszekvenciákon és nem publikált izolátumokból (ssDNS), metagenomokból és provírusokból, azaz baktériumokban vagy archeális gazdasejtben tartózkodó vírusgenomokból származó jó minőségű genomokon tanították. Minden random forest modell egy „vírusosság” pontszámot ad, amely segítségével meghatározható,

hogy a bemeneti szekvencia milyen valószínűséggel tekinthető az adott víruscsoporthoz tartozó részleges vagy teljes genomnak.

Végezetül pedig az előbbi lépésben meghatározott pontszámokat a VirSorter2 egyetlen, predikcióként összegzi a felhasználó számára (J. Guo és mtsai. 2021).

5.2. Neurális hálózat tanítása kondíciópontozásra

5.2.1. Adatgyűjtés

Digitális videófelvételeket készítettem 2 éven keresztül egy SJCAM 4000 RGB kamerával három magyarországi nagylétszámú tejelő szarvasmarhatelepen (F1 gazdaság: 1150 tehén; F2 gazdaság: 880 tehén; F3 gazdaság: 960 tehén). A kamerát körforgós rendszerű fejház egy fix elemén úgy helyeztem el, hogy az a fejés során az előtte elhaladó állatok farára irányuljon (5.2. ábra). A videókat különböző fényviszonyok között készítettem a hajnali és déli fejések alkalmával, mindhárom telepen. Mivel a hajnali és déli fejés során nem azonos a fejőrendszer forgásának sebessége, ezért a kamera előtt elhaladó állatok száma egységnyi idő alatt sem egyenlő a két esetben. Továbbá a felhasználható képek kiegyenlítetttségét fokozza, hogy a felvételek készítése során a fejőrendszer forgását akár több alkalommal is meg kellett állítani különböző okokból kifolyólag (pl.: nem fejeződik be egy állat fejése azelőtt, hogy megtenne egy teljes kört, nem érkezett meg a fejésre jövő állatok következő csoportja, torlódás van a fejből kifelé vezető úton, stb.). A videókészítés módjából adódóan csak tejtermelő (DIM: ~5-220) állatokról születtek felvételek, üszökről és szárazonálló tehenekről nem. Az egyes videók nem rögzítették a teljes fejt állományt, így mindig csak a tejtermelő állomány egy kis szelete került be az adatbázisba. Annak elkerülése érdekében, hogy az adatsorban ne legyen túlreprezentált egy adott testmérettel rendelkező tehén, az egy helyszínen készült két videófelvétel között legalább egy hónapot kihagytunk.

5.2.2. Adatok előfeldolgozása

A felvett videókat később *Visual Object Tagging Tool (VoTT)* (2020) segítségével annotáltam, hozzárendelve egy határoló téglalapot az állat farához, valamint egy becsült BCS értéket. A pontozás 1–5 közötti skálán történt. A skálán 12 szintet határoztunk meg: az 1,0–2,5 és a 4,0–5,0 közötti tartományok 0,5-ös léptékekre, míg a 2,5–4,0 közötti intervallum finomabb, 0,25-ös léptékekre volt felosztva (Ferguson és mtsai. 1994).

A pontozást és a kézi annotációt a felvételek elkészülte után végeztem. A felvételeken képkockaként bekereteztem azokat a területeket, amit a kondíciópontozás során figyelembe vettem. Majd a kiválasztott területhez hozzárendeltem egy BCS-osztályt. A videófelvételeken szereplő állatokról több szögből is készítettem annotációt, azonban BCS predikcióhoz csak azokat a felvételeket használtuk, amelyen a far a kamerához legközelebbi ponton volt. Ezek voltak a végleges képek, amelyekből a tanító-, a validációs- és a teszhalmazokat felépítettük. A vizsgálat során készített videók annotálása után Label Studio (Tkachenko és mtsai. 2020-2022) segítségével újra ellenőriztem és módosítottam az annotációkat.

Az F1 és F2 azonosítójú szarvasmarha telepen készült képeket felosztottuk a tanító és a validációs halmazokra. Ezt a BCS-pontszámok rétegzésével végeztük. A rétegzést úgy valósítottuk



5.2. ábra. A kamera elhelyezése a videófelvételek készítése során

meg, hogy az egyes pontszámszinteken belül a képek 80%-át véletlenszerűen kiválasztottuk a tanító halmazba, a fennmaradó képekből létrehoztuk a validációs halmazt. Ez biztosította, hogy a tanító és a validációs halmazok ugyanazokat az osztályeloszlásokat tartalmazzák, így a validációs halmaz loss értéke megfelelő mérőszám a modellválasztási döntésekhez.

Az F3 telepen készült képeket független teszhalmazként megtartottuk. Az egyes halmazokban szereplő képek BCS-osztályonkénti darabszámát az 5.1. táblázat foglalja össze.

A kezdeti annotációt követően a téglalapok helyét és méretét a képeken a következőképpen változtattam meg az F3 gazdaság felvételein. Három különböző méretű téglalapot helyeztem el a telepen készült képeken (5.3. ábra). A nagy (*l*) négyzetet az állat képén nagyjából a csípő teljes szélességében, a faroktőtől a térd magasságáig. A közepes (*m*) doboz szintén a csípő teljes szélességét foglalja magában, azonban a faroktőtől csak a péra alapjáig terjedt. Míg a kis (*s*) doboz az ülőgumókat és a faroktövet keretezi. Minden képhez 3 különböző predikciót készítettünk a doboztípusok szerint.

5.2.3. Modellarchitektúra kiválasztása

A testkondíció pontozása egy objektumdetektálási és osztályozási probléma egyszerre. Ezért olyan objektumdetektálási modellt választottunk, amely mind a pontozás alapjául szolgáló területet határoló dobozt, mind az osztályok ground truth annotációit felhasználja. A Faster R-CNN (Ren és mtsai. 2015) egy olyan modell, ami alkalmazható lokalizációs és osztályozási feladatokban. A modellezéshez a Faster R-CNN architektúra Detectron2 (Wu és mtsai. 2019)

5.1. táblázat. A vizsgálatba bevont annotált képek száma pontszámonként. Az F1 és F2 helyekről származó képeket használtuk a tanító és a validációs halmazok létrehozásához, míg a visszatartott teszhalmaz csak az F3 helyről származó képekből állt.

BCS	F1 & F2 telep		F3 telep
	Tanító	Validáció	Teszt
1,00	162	41	22
1,50	215	54	31
2,00	363	91	53
2,50	370	93	65
2,75	182	46	42
3,00	323	81	41
3,25	381	95	50
3,50	659	165	66
3,75	74	18	9
4,00	58	14	11
4,50	46	12	6
5,00	89	22	11
Összesen:	2922	732	407

implementációját választottuk. Minden modellt a Model Zoo kódtárból ⁶ töltöttünk le, a COCO adathalmazon ⁷ előzetesen betanított hálózati paraméterekkel.

5.2.4. Modellértékelés

A modellünk lokalizációs teljesítményét az AP50 mérőszám segítségével értékeltük. Ez az érték növekszik, ha a prediktált határoló dobozok jobban átfednek az alapigazsághoz tartozó annotációk határoló dobozaival. A képen lévő objektum észlelése mellett a Detectron2 megbecsüli az osztályok valószínűségi eloszlását az összes osztályra vonatkozóan. Végső osztályozásként az objektumot ahhoz az osztályhoz rendeli, amelynek valószínűsége a legmagasabb az összes lehetséges osztály közül. A predikciók minőségét a Cohen-féle kappa (Cohen, 1960) és a predikciós pontosság segítségével számszerűsítettük.

A Cohen-féle kappa értékek a következőképpen értelmezhetők: 0 – 0,20 = nincs, 0,21 – 0,39 = minimális, 0,40 – 0,59 = gyenge, 0,60 – 0,79 = közepes, 0,80 – 0,90 = erős és 0,90 fölötti = szinte tökéletes egyezés (McHugh, 2012). Az „egy az összes ellen” sémát követve a predikció pontosságát úgy számoltuk ki, hogy minden egyes osztályt összehasonlítottuk a többi osztállyal az $accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$ képlettel, és ezekből az eredményekből az átlagos predikciós pontosságot adtuk meg.

⁶Model Zoo: előtanított mélytanulási modellek gyűjteménye, amelyek szabadon használhatók a tanítás felgyorsítására.

⁷COCO (Common Objects in Context) adathalmaz: egy nagyméretű (több, mint 330 000 képet tartalmazó), objektum detekciós, szegmentálási és feliratozási feladatokhoz készített adathalmaz. Széles körben használják ML modellek tanítására és értékelésére.

5.2. táblázat. Modell kiválasztása. A Detectron2 tíz előre betanított modelljét futtattuk ugyanazon az adathalmazon, ugyanazokkal a beállításokkal (epochok száma: 15). Minden további kísérlethez a legkisebb validációs loss-szal rendelkező modellt választottuk.

Előtanított Faster R-CNN Modell	Validációs Loss
R_50_FPN_3x	0,0612
R_101_FPN_3x	0,0628
R_50_FPN_1x	0,0637
X_101_32x8d_FPN_3x	0,0662
R_50_DC5_1x	0,0796
R_50_DC5_3x	0,0840
R_101_C4_3x	0,0848
R_101_DC5_3x	0,0848
R_50_C4_1x	0,1019
R_50_C4_3x	0,1040

5.2.5. Modell szűrés

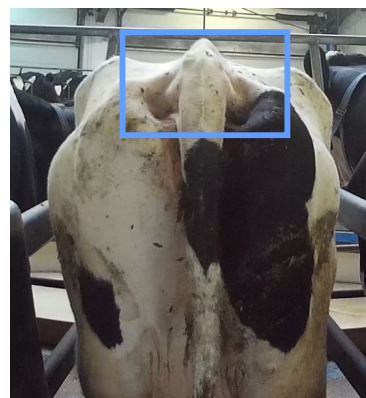
A felvázolt problémához legmegfelelőbb modell használata érdekében a Detectron2 10 előzetesen betanított modelljét tovább tanítottuk és validáltuk az adathalmazainkon, mindegyiküket azonos hiperparaméterekkel 15 epochon keresztül. Ebben a modellválasztási fázisban a nyers BCS-pontszámokat három osztályba soroltuk (BCS-osztályok: <2,5, 2,5 és 3,75 között, valamint >3,75). A R_50_FPN_3x modell adta a legkisebb validációs losst, ezért ezt az előzetesen betanított modellt választottuk és használtuk minden további kísérletben (5.2. táblázat).

5.2.6. Modelltanítás és predikció

Az annotációt követően több különböző feladat megoldására tanítottuk a kiválasztott modellt. A határoló dobozok méretében és az osztályok számában is változásokat eszközöltünk. A különböző módszereket taglalom ebben a fejezetben.

5.2.6.1. Három különböző méretű határoló dobozzal

A kezdeti annotációt követően a téglalapok helyét és méretét a képeken kétféleképpen módosítottuk. A módosításokkal az eredeti határoló doboz mellett két kisebb méretű dobozzal is dolgoztunk. Ezzel az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk, a modellünk predikciós pontossága mennyiben függ a rendelkezésére bocsátott információ mennyiségétől. Ebben az esetben az információmennyiség alatt a bekeretezett terület mérete értendő. A három féle határoló doboz mérete és helyeződése a következőképpen alakult. A nagy (*l*) négyzetet az állat képén nagyjából a csípő teljes szélességében, a faroktőltől a térd magasságáig. A közepes (*m*) doboz szintén a csípő teljes szélességét foglalja magában, azonban a faroktőltől csak a péra alapjáig terjedt. Míg a kis (*s*) doboz az ülőgumókat és a faroktövet keretezi. A címkézés során három különböző méretű téglalapot helyeztem el az F3 gazdaság képein (5.3. ábra). Ezt az adathalmazt használtuk a határoló dobozok automatizált elhelyezésének tanításához. Az F3 gazdaság képeinek 80%-ából létrehoztunk egy tanítóhalmazt, és 20%-ából egy validációs halmazt. Ezeket használtuk a Detectron2 R_50_FPN_3x előtanított modelljének betanításához. A tanítás so-

Nagy (*l*)Közepes (*m*)Kicsi (*s*)

5.3. ábra. A különböző méretű határoló téglalapok. A nagy (*l*) dobozt a két külső csípőszöglet (*tuber coxae*) szélességében helyeztük el a farokcsigolyáktól (faroktő) a combközépig. A közepes (*m*) doboz az előzővel megegyező szélességű, de a magassága csak a faroktőtől nagyjából a *symphysis pelvisig* tart. A kis (*s*) doboz csak a két ülőgumó (*tuber ischii*) és a faroktövet keretezi, magába foglalja az ülőgumó és a farokcsigolyák közötti mélyedést, valamint a *tuber coxae* és a keresztcsonti nyúlványok közötti területet.

rán 100 iterációnként rögzítettük a validációs loss- és AP-értékeket, és megtartottuk a legjobb eredményt adó súlyokat. A betanított modell segítségével prediktáltuk a háromféle annotációs négyzetet a másik két gazdaság képeire is, és ezeket használtuk a további munka során. A határoló téglalapokat utólag vizuálisan validáltam.

5.2.6.2. 12 BCS-osztállyal

A kiválasztott, előzetesen betanított modell segítségével az első kísérletet a 12 szintű, ordinális pontozási skála annotációin való tanítással, validálással és teszteléssel végeztük el. Ezt a három különböző méretű határoló téglalap esetében (5.3. ábra) külön-külön megismételtük. A modell optimális súlyait ott határoztuk meg, ahol az a legkisebb validációs loss-értékekkel és legnagyobb AP50-ekkel rendelkezett. Ezeket használva készítettünk predikciókat a validációs és tesztalmazok képein is, mert szeretnénk látni, hogy milyen eltérés van a validációs halmazon készült predikciók és a független tesztalmazon készült predikciók között osztályba sorolási valószínűségek mentén predikciós pontosság és Cohen-féle kappa tekintetében. Az adott képhez tartozó kondíciópont-predikciónak azt az osztályt tekintettük, amelynek az osztálybasorolási valószínűsége a legnagyobb volt, függetlenül attól, hogy az jelentősen eltért a következőtől, vagy csak kis mértékben. A „megjósolt osztályok valószínűségeit” is megtartottuk, mivel ezek a modell adott predikcióra vonatkozó megbízhatóságának mértékét jelentik. Yukun és mtsai. (2019) megközelítését követve a modell predikcióit 0, 0,25 és 0,5 hibahatárok-kal értékeltük. A BCS skála ordinális jellegét figyelembe véve, lehetővé tettük, hogy a „közel hibás” predikciókat helyesnek definiáljuk, csökkentve a mérés szigorúságát.

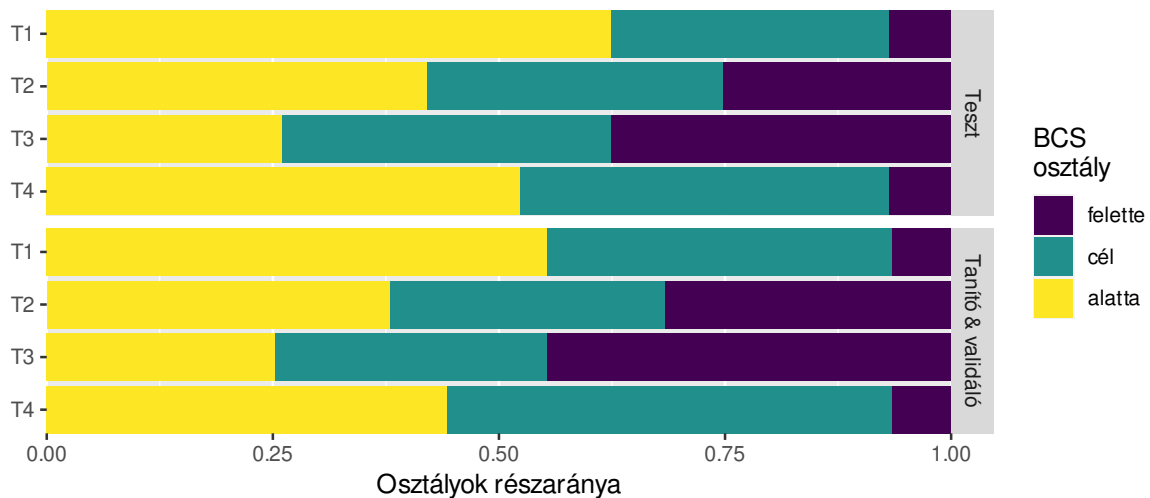
5.2.6.3. Három BCS-osztállyal

A 12 pontos BCS-skála mellett a nagyobb gyakorlati jelentőséggel bíró, tágabb BCS-osztályok szerint is értékeltük a predikciók minőségét. Az összes eredeti BCS címkét besoroltuk három BCS osztályba: sovány, normál és túlsúlyos. Mivel a laktáció egyes szakaszaiban az optimális BCS-tartomány eltérő, négy különböző (T1, T2, T3 és T4) célintervallumot határoztunk meg, valamint az ezekhez tartozó alacsony és magas kondíciós artományt. Ezeket a céltartományokat az 5.3. táblázat foglalja össze.

T1, az elléskor (DIM: 0) és a szárazon állás időszakában (DIM: -60 és -1 között), valamint a laktáció zárásakor (DIM > 300 és DIM: < -60 között) követendő; T2 a laktáció korai (DIM: $1 - 30$) és a laktáció középső szakaszában (DIM: $101 - 200$) alkalmazható céltartományként; T3 a laktáció csúcsán (DIM: $31 - 100$) és T4 a késői laktációban (DIM: $201 - 300$) jelent segítséget. Három új BCS-osztályt hoztunk létre minden laktációs periódushoz: célintervallum alatt (sovány), a célintervallumban és a célintervallum felett (túlsúlyos). Azt vizsgáltuk, hogy ezek a gyakorlati szempontok alapján alkotott osztályok, mennyire jól prediktálhatók függetlenül a képeken szereplő állatok tényleges laktációs állapotától vagy életkorától. A tanító, validációs és tesztelési munkameneteket ezzel a három új osztállyal futtattuk le újra mind a négy értékelési rendszerre (T1-4) és a három különböző méretű határoló téglalapra (s , m , l) vonatkozóan. A modell minden kísérletben ugyanazokat a bemeneti képeket használta, a címkék definíciója változott az egyes kísérletekben. Az 5.3. táblázatban a képek átminősítés utáni arányát mutatja a tanító, a validációs és a tesztalmazban. Az osztályok aránya azonos volt a tanító és a validációs halmazban (F1 és F2 telep) és a tesztalmazban (F3 telep). Ezzel tettük lehetővé a valós tesztelést, mivel az osztályok kiegyensúlyozatlansága azonos volt a tanító-, a validációs-, valamint a tesztalmazban. A 3 osztályra és a 12 osztályra történő tanítás folyamatának összehasonlítása érdekében megismételtük az elemzést úgy, hogy a modell 12 osztályt prediktált, de ezeket a következtetéseket a már említett 3 osztályba soroltuk.

5.3. táblázat. Pontszám célintervallumok és részarányuk. Az egyes céltartományok határértékeinek megfelelően osztályoztuk az eredeti pontszámokat. A T1 periódusban több olyan kép volt, ahol a tehenek az „célérték alatti” osztályba tartoztak, míg ha a T2 küszöbértékek szerint soroljuk be az az adatokat, akkor a három osztály egyenletesebben oszlott meg. Az osztályok eloszlása a tanító és a validációs halmazokban megegyezik a megfelelő teszhalmazokkal.

	Cél BCS-intervallum		Laktációs szakasz (DIM)
	Minimum	Maximum	
T1	3,25	3,75	0, (-60)-(-1), (>300)-(-61)
T2	2,75	3,25	1-30, 101-200
T3	2,50	3,00	31-100
T4	3,00	3,75	201-300



5.3. Neurális hálózat kombinációja hagyományos diagnosztikai módszerrel

Vizsgálatunkban, mint számos hasonló munkában, a 200 000 sejt/mL-t meghaladó SCC értéket, a klinikai tünetek hiánya ellenére is IMI-nek tekintjük. A detekció minőségét a szakirodalomban elérhető CMT predikciós adatok segítségével, az általunk tanított ANN, illetve ezek kombinációjának predikciós hatékonyságával vizsgáljuk. A két mérték, amit ebben a becslésben használtunk a negatív prediktív érték ($NPV = (1 - P) \times SE / (P \times (1 - SE) + (1 - P) \times SP)$) és a pozitív prediktív érték ($PPV = P \times SE / (P \times SE + (1 - P) \times (1 - SP))$) voltak (Thrusfield, Christley, 2018). A formulákban a P a pre-test probability-t, az SE és az SP az alkalmazott teszt szenzitivitását, illetve specificitását jelentik.

A gyakorlatban az SCC 200 000/mL fölé emelkedését leggyakrabban a szubklinikai tőgygyulladás jeleként értékelik. Ezért az SCC megemelkedett voltának pre-test probability-jének becslésére a szakirodalomban előforduló SM prevalenciákat használtuk. Mivel a különböző országokból származó prevalencia értékek széles tartományban mozognak (Ausztrália: 28,9% (Plozza és mtsai. 2011); Brazília: 45,4-49,6% (Busanello és mtsai. 2017); Finnország: 19,0-22,3% (Hiitiö és mtsai. 2017); Indonézia: 68,2% (Khasanah és mtsai. 2021)), ezért a prediktív értékeket a 0,19-0,68 pre-test probability tartományra vonatkozóan becsültük.

A CMT-re vonatkozó klasszifikációs megbízhatóság a szakirodalomban jelentős változatosságot mutat. A 2000. év után született közleményekből olyan adatokat gyűjtöttünk ki a vizsgálatunkhoz, amelyek nem tőgynegyed, hanem tehén szinten mutattak be szenzitivitási és specificitási adatokat. Az SCC 200 000-es határhoz kapcsolhatóan a következő értékpárokat használtuk: SE: 0,69, SP: 0,72 (Dingwell és mtsai. 2003); SE: 0,70, SP: 0,48 (Sanford és mtsai. 2006); SE: 0,95, SP: 0,78 (Fosgate és mtsai. 2013); SE: 0,71, SP: 0,57 (Gohary, McDougall, 2018); SE: 0,95, SP: 0,81 (Kandeel és mtsai. 2018).

A neurális hálózattal való klasszifikációhoz két adatállományt használtunk fel. Az egyik telepen használt telepírányítási (RISKA) rendszer, amelyben az állatok egyedi azonosítójához rendelve, számos egyéb adat mellett tárolják a havonta egyszer, tehén szinten, egy fejésben meghatározott SCC értékeket. Ebben az adatbázisban 2019.10.28. és 2021.04.27. közötti időszakban 18 dátumhoz, 1 368 egyedhez állt rendelkezésre SCC-adat. A másik adatbázist a fejőház saját telepírányítási programja (ALPRO) hozza létre. A program rögzíti és tárolja a tejre, tejleadásra vonatkozó adatokat, melyeket a fejések során automatizáltan mér az összes tehén esetében egyedileg.

A két adatállományt a tehenek egyedi azonosítóján keresztül kapcsoltuk össze, és minden egyedhez az SCC-adat dátumát megelőző 3. napig leszűrtük a reggeli fejésekre vonatkozó mért adatokat. Az SCC-értékek alapján létrehoztunk egy, a későbbiekben függő változóként használt binomiális mezőt, amelynek értéke 1 lett, ha az SCC értéke 200 000 sejt/mL felett volt, illetve 0, ha alatta. A caret (Kuhn, 2023) csomag függvényeivel, R-környezetben (R Core Team, 2022) a korreláló magyarázóváltozókat kiszűrtük és egy binomiális általánosított lineáris modell felhasználásával becsültük a magyarázó változók fontosságát (*variable importance*). A variable importance egy olyan pontszám, amely azt jelzi, hogy egy adott feature mennyire „fontos” a modell számára. Ebben az esetben a neurális hálózat tanítására hármat meghaladó variable importance értékű magyarázó változókat tartottuk meg: az SCC-mérésének napjához tartozó PeakCondLevel (lefejt tej maximum vezetőképessége a fejés során mS-ben), AvgCondLevel (a lefejt tej átlagos vezetőképessége a fejés során mS-ben), RelativeCond (a tej vezetőképességének megváltozását fejezi ki), Yield (leadott tej mennyisége kg-ban), YieldIsLow (az egyedi termeléshez képest történő termelés csökkenés bináris kifejezése), az aktuális laktáció száma, a laktációban eltöltött napok száma (DIM), valamint az SCC-mérés napját megelőző 1., 2. és 3. napon mért PeakCondLevel. Az így létrehozott adatállomány 7685 rekordot tartalmazott.

Az ANN-ek tanítását TensorFlow (Abadi és mtsai. 2015) felhasználásával, egy Tesla V100 32GB GPU-n végeztük. Az adatállományt 70/30%-os arányban felbontottuk két részre. A kisebbik rész szolgált tesztalmozsként. A nagyobbik részt ugyancsak 70/30%-os arányban tanító és validációs halmazra bontottuk. A rétegek számát 1-4 között, a rétegenkénti neuronok számát 64-512 között 64-es lépésekkel változtatva az összes lehetséges kombinációval létrehoztunk ANN-eket. A legjobb modell megtalálása céljából ezeket az ANN-eket tanítottuk, és klasszifikációs teljesítményüket értékeltük. Az 50 epochon keresztül tartó tanítás során a validációs adathalmazon kapott loss csökkentése mellett, a callbackben ⁸ 0,9 értékű specificitás mellett maximalizáltuk a szenzitivitást. Minden epoch után, ha a szenzitivitás meghaladta a korábbi legmagasabbat, akkor a hálózathoz tartozó súlyokat mentettük. A mentett súlyokkal végül, a

⁸Callback: olyan függvény, amely egy másik függvény argumentumaként adódik át egy kódrészletnek azért, hogy végrehajtsa azt.

teszthalmaz felhasználásával, egy NVIDIA GeForce P8 2GB GPU-n végeztük a klasszifikációt és az itt legjobb F1-értéket adó modellt használtuk a későbbi elemzésekben.

Ha az SCC megemelkedésének vizsgálatában kombináljuk az ANN-t és a CMT-eket, akkor az ebből várható szenzitivitás ($SE_{parallel}$, SE_{serial}) és specifitás ($SP_{parallel}$, SP_{serial}) megváltozik. Párhuzamos tesztelés esetén a klasszifikációs hibák becslése: $SE_{parallel} = 1 - (1 - SE_{ANN}) \times (1 - SE_{CMT})$, $SP_{parallel} = SP_{ANN} \times SP_{CMT}$. Sorozatban végzett tesztelésnél: $SE_{serial} = SE_{ANN} \times SE_{CMT}$, $SP_{serial} = 1 - (1 - SP_{ANN}) \times (1 - SP_{CMT})$ (Marshall, 1989). Ahol az SE_{ANN} és az SP_{ANN} az általunk tanított neurális hálózattal a teszthalmazon végzett predikciókból becsült szenzitivitás és specifitás, míg az SE_{CMT} és az SP_{CMT} pedig a CMT szakirodalomból (Dingwell és mtsai. 2003; Fosgate és mtsai. 2013; Gohary, McDougall, 2018; Kandeel és mtsai. 2018; Sanford és mtsai. 2006) kigyűjtött szenzitivitása és specifitása.

5.4. Neurális hálózat tanítása mikrobiológiai adatokkal

5.4.1. Adathalmaz létrehozása

A baktériumtelepek detektálása céljából Detectron2 környezetben, 10 előtanított Faster R-CNN modellt (5.2. táblázat) tanítottunk. Ehhez a munkacsoportunk által korábban létrehozott, manuálisan annotált (a telepeket tartalmazó határoló dobozokkal) adathalmazt használtuk (Makrai és mtsai. 2023). Az adathalmaz létrehozása során 24 gazdasági-, járványtani- és élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős baktériumfajt tenyésztettünk különböző tápanyagigényeiket figyelembe véve (5.4 táblázat).

Az adatbázishoz szükséges felvételek alapjául szolgáló tenyészeteket a következő módszerrel állítottuk elő. A -80°C -on, ultra alacsony hőmérsékletű fagyasztóban tárolt baktériumtörzsekből megfelelő táptalajokra oltottunk, majd a faj igényeinek megfelelően inkubáltuk a tenyészeteket. A következő napon a tenyészet egy adott fajra jellemző tipikus morfológiát mutató telepét átoltottuk egy új táptalajra. Az ezt követő napon szintén egy telepet tripton szójalevesbe (TSB) oltottuk, és 24 órán át 37°C -on inkubáltuk. Az így létrejött tenyészetekből tízes alapú hígítási sorozatot készítettünk. Ezt követően hígításonként $50\ \mu\text{l}$ -nyi táplevest felhasználva szilárd táptalajra szélesztettünk a mintákból. A végső, 24-48 órán át tartó 37°C -on történő inkubálás után digitális képeket (5.4. ábra) készítettünk a tenyészeteket tartalmazó Petri-csészékről fehér és fekete hátterek előtt (Makrai és mtsai. 2023). Az így készített 373 fényképen összesen 57 028 baktériumtelepet annotáltunk. A baktériumok szerinti kép és telepeloszlást az 5.5. ábra foglalja össze.

5.4.2. Modellek tanítása

Az előzőekben leírt adathalmazt úgy bontottuk fel, hogy a tanító halmaz 276 (41 483 annotáció), a validációs halmaz 96 (17 468 annotáció) felvételt tartalmazott. A telepek annotációjában a fajonkénti osztályozás helyett egy „baktérium” kategóriát hoztunk létre. Mivel a képek eltérő méretűek voltak, ezért a tanításhoz egységes méretre ($6200 \times 6200\ \text{pt}$) transzformáltuk azokat. Minden előtanított modellt 100 epochon keresztül tanítottunk, úgy hogy 100 iterációnként validációt végeztünk. A validáció során mindig eltároltuk azokat a súlyokat, amelyek az azt

5.4. táblázat. Az adathalmazban szereplő baktériumfajok. A második oszlop a Gram-szerinti festődést írja le. A tenyésztés oszlop azt mutatja, hogy a baktérium aerob vagy anaerob környezetet igényel-e, az agar oszlop pedig azt a táptalajt, amelyben tenyésztik. Az utolsó két oszlop azt jelzi, hogy a fajnak szüksége van-e nikotinamid-adenin-dinukleotidra (NAD) vagy CO_2 -ra az inkubáció során.

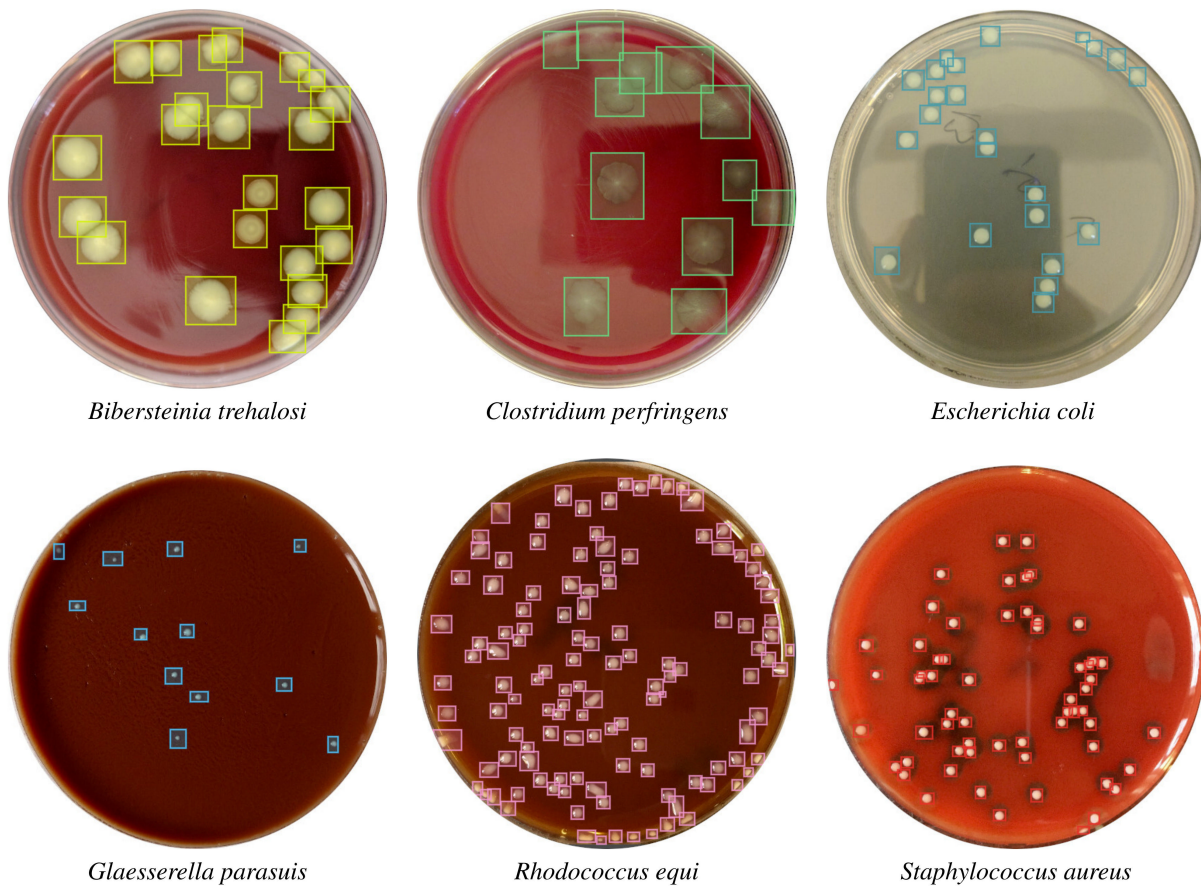
Bakteriumfaj	Gram-szerinti festődés	Tenyésztés	Agar	Igény	
				NAD	CO_2
<i>Actinobacillus equuli</i>	-	aerob	véres		
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	-	aerob	csokoládé	+	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	aerob	véres		
<i>Bacillus cereus</i>	+	aerob	véres		
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	-	aerob	véres		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	aerob	véres		
<i>Brucella ovis</i>	-	aerob	véres		+
<i>Clostridium perfringens</i>	+	anaerob	véres		
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	+	aerob	véres		
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+	aerob	véres		
<i>Escherichia coli</i>	-	aerob	közönséges		
<i>Glaesserella parasuis</i>	-	aerob	csokoládé	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	aerob	véres, közönséges		
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	aerob	véres		
<i>Paenibacillus larvae</i>	+	aerob	véres		+
<i>Pasteurella multocida</i>	-	aerob	véres		
<i>Proteus mirabilis</i>	-	aerob	MacConkey		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	aerob	véres		
<i>Rhodococcus equi</i>	+	aerob	véres		
<i>Salmonella enterica</i>	-	aerob	közönséges		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	aerob	véres		
<i>Staphylococcus hyicus</i>	+	aerob	véres		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	aerob	véres		
<i>Trueperella pyogenes</i>	+	aerob	véres		

megelőző súlyokhoz képest kisebb validációs loss-t adtak. A tanítás eredményeként így mind a 10 előtanított modellre kaptunk egy-egy legkisebb loss-t adó súlygyűjteményt.

A súlygyűjtemények és egy független képgyűjtemény felhasználásával baktériumtelep detekciós predikciókat végeztünk. A baktériumtelepek növekedésének vizsgálatára használt adathalmaz a Bär és mtsai. (2020) által a Figshare-en megosztott, nem annotált, digitális felvételekből állt. A szerzők 22 *Staphylococcus aureus* tenyészetéről készítettek 10 percenként digitális felvételeket. Az egyes tenyészetekről 410, illetve 423 felvételt készítettek. A 22 tenyészetből 8 kontroll (Ctrl) és 14 rifampicinnel kezelt tenyészet volt (6.2. táblázat). A Ctrl tenyészeteket a szélesztést megelőzően 24 órán keresztül rifampicinnel előkezelt táptalajon hozták létre. Minden tenyészetéről a 410. számú felvételig készült képeket használtuk fel a baktériumdetekcióhoz. Így a predikciókat minden tenyészet 1-410. sorszámú felvételeiből készítettünk a legjobb eredményeket adó súlygyűjtemények segítségével.

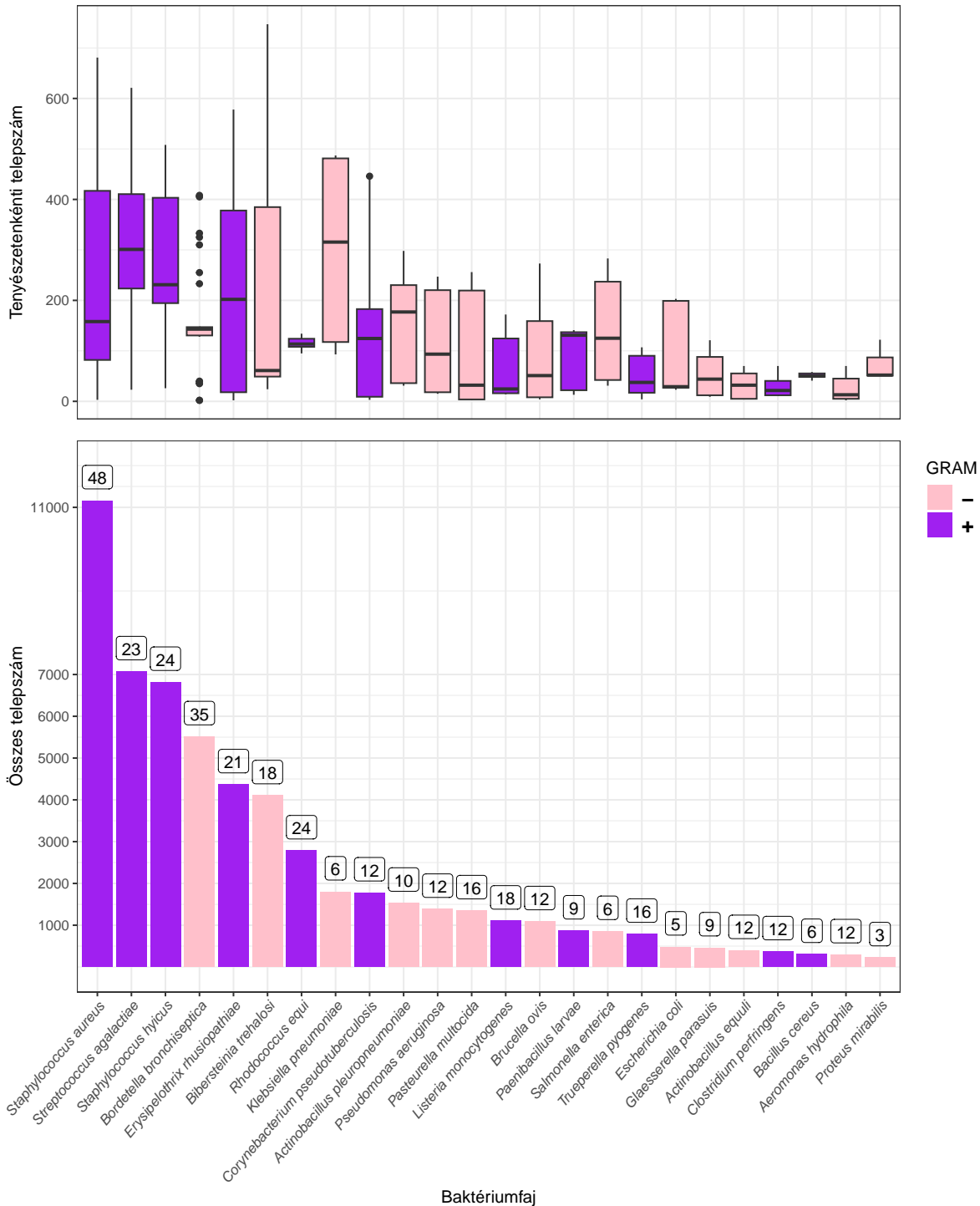
A 22 tenyészet 410 felvételére (6200 × 6200 pt-re transzformált) kapott predikciókat (határoló doboz koordináták, objektumbesorolási valószínűség) eltároltuk mindegyik modell esetében. A CNN tanítását és a predikciókat egy Tesla V100 32GB GPU-n végeztük.

Az adatok további feldolgozását, az eredmények ábrázolását R-környezetben (v4.2.1) (R Core Team, 2022) végeztük, a broom (Robinson és mtsai. 2023), broom.mixed (Bolker, Robinson,



5.4. ábra. 24 baktériumfajból hat tenyésztet Petri-csészében, a jellegzetes kolóniákat határoló dobozokkal jelölve. Az egyes fajokat a megfelelő táptalajon tenyésztették, pl. *B. trehalosi*, *C. perfringens*, *R. equi* vagy *S. aureus* vér-agaron, *G. parasuis* csokoládé-agaron és *E. coli* tápanyag-agaron.

2022), ggplot2 (Wickham, 2016), sf (Pebesma, 2018), tmap (Tennekes, 2018), xtable (Dahl és mtsai. 2019) csomagok használatával. A modell által prediktált telepeket befoglaló határoló dobozok közül csak azokat tartottuk meg a további elemzésekben, amelyeknek az objektumpredikciós valószínűsége meghaladta a 0,5 értéket. Ezeknek a koordinátáiból négyzeteket generáltunk. A 410. időpontban készült képeken prediktált objektumok közül kigyűjtöttük azokat, amelyeknek az objektumpredikciós valószínűsége meghaladta a 0,95 értéket. Ezek reprezentálták a telepek végleges állapotát, méretét. Tapasztalataink alapján azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a *S. aureus* esetén a baktériumtelepek növekedése során a középpontjuk nem mozdul el jelentősen. Ezért a telepek növekedésének követése (*tracking*) során azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a telep időben legutolsó állapotát leíró határoló doboz legtöbbször tartalmazza az időben megelőző állapotokhoz tartozókat. Ennek megfelelően minden végleges telepállapotot leíró határoló dobozhoz kigyűjtöttük azokat a megelőző időpontban prediktált határoló dobozokat, amelyek teljesen beleestek a véglegesbe. Ezek sorozatát használtuk a telepek növekedési sebességének becslésére. A baktériumtelepek növekedését befolyásolja, hogy milyen sűrű az elhelyezkedésük a tenyészetben. Azt, hogy az egyes telepek környezetében több vagy kevesebb, a növekedésüket befolyásoló telep helyezkedik-e el, a közvetlen szomszédok számával (NB) jellemeztük. Közvetlen szomszédnak tekintettünk két telepet, ha



5.5. ábra. A telepszámok eloszlása fajok és képek szerint. Az oszlopdigrammok az annotált baktériumtelepek teljes számát ábrázolják fajonként, valamint a fajokhoz tartozó képek számát az oszlopok felett. A boxplotok az annotációk képenkénti eloszlását foglalják össze. A grafikon színezése a baktériumfajok Gram-festését mutatja.

az azokat határoló határoló dobozok bármilyen mértékű átfedésben vannak. Eredményeink a Bär és mtsai. (2020) munkájával való összehasonlíthatósága céljából a telepek méretének leírására azok sugarát használtuk. A telepsugarat a prediktált határoló dobozok szélességének felével becsültük. Mind a 10 modell súlygyűjteményével végzett predikciójára alapozott sorozat-

tok elemzésével kiválasztottuk azt a modellt, amelyik az egyes telepekhez tartozó sorozatban a legtöbb elemet, illetve a határoló dobozok alapján a legkisebb sugarat eredményezte. Így a legjobb modell az X_101_32x8d_FPN_3x előtanított modell tanítása alapján létrejött modell lett, az ebből kapott predikciókra alapozott eredményeket mutatjuk be.

A telepek megjelenésének becslésére minden tenyészetre vonatkozóan kigyűjtöttük azt az első időpontot, amikor a CNN telepnövekedési sorozathoz tartozó telepet detektált. A Bär és mtsai. (2020) eredményeivel való összehasonlíthatóság céljából a telepsugár növekedésének becslésére használtuk a tenyészetenkénti lineáris modellt. Mivel statisztikai szempontból az ugyanazon tenyészeteken történt mérések ismételt mérésnek tekinthetők, ezért a tenyészetet random faktorként kezelve, *mixed effect lineáris modellt* is alkalmaztuk a telepnövekedés becslésére. Bär és mtsai. (2020) munkáját követve a telepnövekedés elemzésében a tenyésztés első 24 órájára prediktál telepsugarakat használtuk.

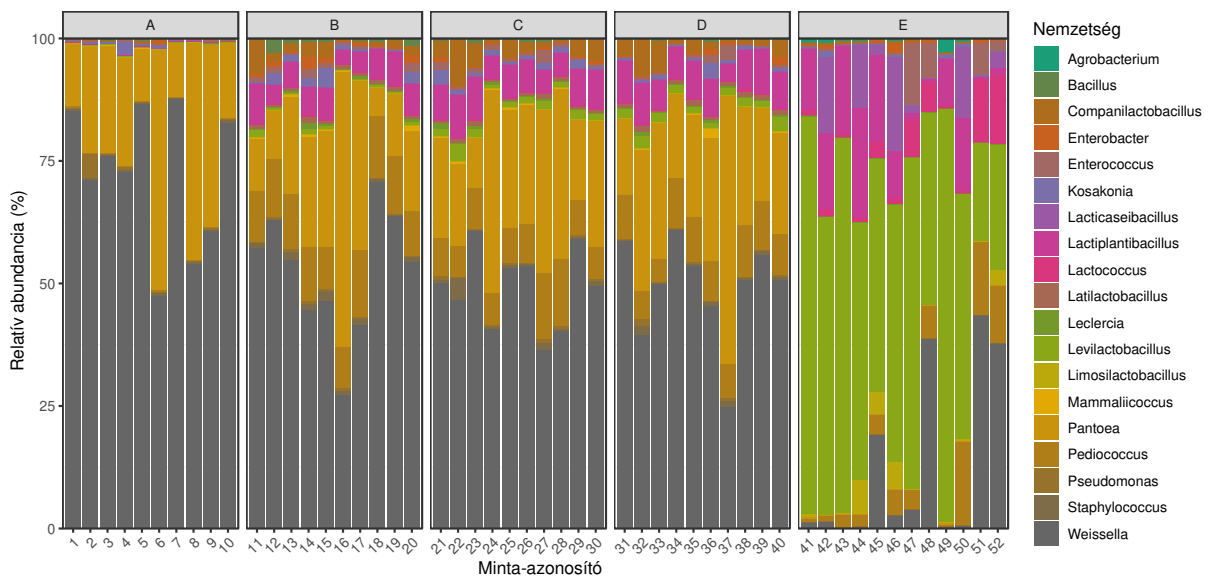
6. Eredmények

6.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének és mobilitásuk szilázsban

A növények teljes referencia genomjait tartalmazó adatbázis alapján végzett rendszertani osztályozás szerint a vizsgált szilázs mintákban jelen lévő legdominánsabb növényfaj a *Medicago* nemzetséghez tartoztak, azon belül feltételezhetően lucernáról van szó (*Medicago sativa*). Az 52 shotgun metagenom-szekvenált minta elemzésének eredményeit a következő szakaszok foglalják össze. A bakteriom¹ és az azonosított ARG-k (rezisztom²) bemutatását követően az ARG-k mobilitási potenciáljára vonatkozó predikciókat is összefoglaltam azon genetikai jellemzők alapján, amelyek jelentős szerepet játszanak a horizontális géntranszferben.

6.1.1. Bakteriom

A taxonok szerint a bakteriális genomokhoz illeszkedő readok száma mintánként eltérő volt (medián: $20,6 \times 10^6$, IQR: $2,9 \times 10^6$). A bakteriális találatok több mint 1%-át elérő nemzetségek relatív gyakoriságát mintánként, a 6.1. ábra mutatja.



6.1. ábra. Szilázs bakteriom. Azon nemzetségek relatív gyakorisága, amelyek a baktériumtalálatok több mint 1%-át érték el mintánként. mintákban. A PRJNA495415 projekt elemeit a 0., 7., 14. és 28. napon vették. A, B, C és D csoportba soroltuk. A PRJNA764355 bioprojekt összes elemét az E csoportba soroltuk.

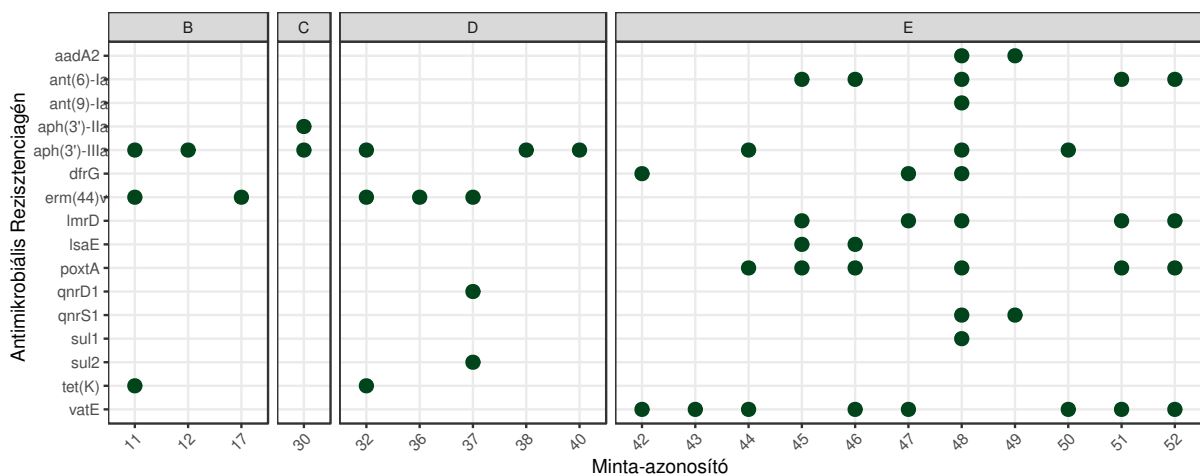
A domináns baktérium nemzetségek (átlagos előfordulási gyakoriságukkal) csökkenő sorrendben a következők voltak *Weissella* (45,7%), *Pantoea* (18,5%), *Levilactobacillus* (13,5%), *Pediococcus* (6,7%), *Lactiplantibacillus* (6,3%), *Companilactobacillus* (1,7%), *Lacticaseibacillus* (1,3%), *Enterococcus* (1,2%), *Lactococcus* (1%), *Kosakonia* (0,8%), *Staphylococcus* (0,6%), *Enterobacter* (0,5%), *Latilactobacillus* (0,5%), *Bacillus* (0,4%), *Limosilactobacillus* (0,4%), *Pseudomonas* (0,4%), *Leclercia* (0,2%), *Mammaliicoccus* (0,2%), *Agrobacterium* (0,1%).

¹bakteriom: Adott minta bakteriális genomjainak összessége (Stern és mtsai. 2019).

²rezisztom: Az ARG-k összessége a bakteriómban (Zhuang és mtsai. 2021).

6.1.2. Rezisztom

A *de novo* létrehozott, ARG-ket tartalmazó, szűrt kontigok hosszának mediánja 4 204 bp volt (IQR: 2 832). A kontigokon talált ARG-k száma 1 és 2 között változott. Az azonosított 16 ARG-típus 54 alkalommal jelent meg az elemzett 52 minta közül 20 mintában. Ezek az ARG-k a következők voltak: *aadA2*, *ant(6)-Ia*, *ant(9)-Ia*, *aph(3')-IIa*, *aph(3')-IIIa*, *dfrG*, *erm(44)v*, *ImrD*, *IsaE*, *poxtA*, *qnrD1*, *qnrS1*, *sul1*, *sul2*, *tet(K)*, *vatE* (6.2. ábra). Az azonosított ARG-k rezisztenciamechanizmusa a következők voltak: antibiotikum inaktiválása (48,1%), az antibiotikum célpontjának védelme (20,3 %), antibiotikum-efflux (13,0 %), az antibiotikum célpontjának megváltoztatása (9,3 %), antibiotikum célpont helyettesítése (9,3 %). A 6.1. táblázat azokat a baktériumfajokat mutatja, amelyekhez az ARG-t hordozó kontigok tartoztak. A táblázat emellett azt is bemutatja, hogy az ARG-k mely gyógyszerosztályok hatástalanítására irányulnak.



6.2. ábra. Mintánként azonosított antimikrobiális rezisztenciagének (ARG). A tökéletes ARG egyezéseket minták szerint ábrázoltuk. A PRJNA495415 0., 7., 14. és 28. napon vett adatait A, B, C és D csoportba soroltuk. A PRJNA764355 projektből származó összes mintát az E csoportba soroltuk.

6.1.3. Mobilom

Összesen 53 feltételezhetően mobilis ARG-t találtunk. Ezek közül tíz ARG integratív mobilis genetikai elemhez (iMGE) kapcsolódik. További két ARG-t profágokban és negyvenegyet plazmidokon detektáltunk. Az iMGE-khez, fágokhoz és plazmidokhoz kapcsolódó ARG-k gyakoriságát a 6.3. ábra foglalja össze baktériumfajok szerinti bontásban.

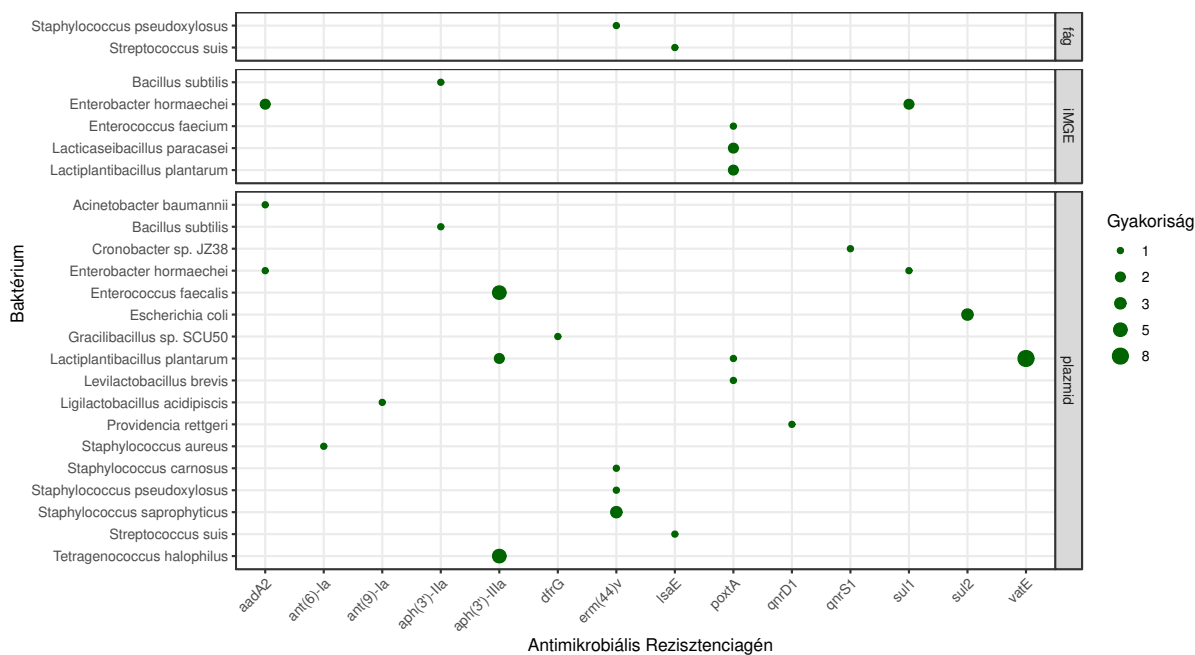
A Johansson és mtsai. (2021) által javasolt távolsági módszerrel öt mintában (30, 45, 46, 48, 52) és öt fajban (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecium*, *Lactisibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*) mutattunk ki integrált mobilis genetikai elemhez kapcsolódó ARG-ket. A 30. mintában a *B. subtilis*hez kapcsolódó *aph(3')-IIa* gént, a 45. mintában az *E. faecium*, az 52. mintában a *L. plantarum* és a 46. mintában a *L. paracasei* *poxtA* génjét mutattuk ki iMGE-hez kapcsolódóan. Az *E. hormaechei*-ben detektált *Sul1* és *aadA2* a 48. mintában szintén iMGE-hez kapcsolódóan találtuk meg.

6.1. táblázat. Azonosított antimikrobiális rezisztencia-gének (ARG-k) és az általuk érintett gyógyszerosztályok baktériumfajonként.

Baktérium	ARG(-k)	Gyógyszerosztály
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>aadA2</i>	aminoglikozid
<i>Amylolactobacillus amylophilus</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	aminoglikozid
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	aminoglikozid
<i>Cronobacter</i> sp. JZ38	<i>qnrS1</i>	fluorokinolon
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>aadA2, sul1</i>	aminoglikozid, szulfonamid
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	aminoglikozid
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>poxA</i>	lincosamid, makrolid, oxazolidinon, fenikol, pleuromutilin, streptogramin, tetraciklin
<i>Escherichia coli</i>	<i>sul2</i>	szulfonamid
<i>Gracilibacillus</i> sp. SCU50	<i>dfrG</i>	diaminopirimidin
<i>Lactocaseibacillus manihotivorans</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	aminoglikozid
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	<i>poxA</i>	lincosamid, makrolid, oxazolidinon, fenikol, pleuromutilin, streptogramin, tetraciklin
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>aph(3')-IIIa, poxA, vatE</i>	aminoglikozid, linokozamid, makrolid, oxazolidinon, fenikol, pleuromutilin, streptogramin, tetraciklin
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>lmrD</i>	lincosamid
<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>poxA</i>	lincosamid, makrolid, oxazolidinon, fenikol, pleuromutilin, streptogramin, tetraciklin
<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	<i>ant(9)-Ia</i>	aminoglikozid
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>qnrD1</i>	fluorokinolon
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ant(6)-Ia, tet(K)</i>	aminoglikozid, tetraciklin
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>erm(44)v</i>	lincosamid, makrolid, streptogramin
<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i>	<i>erm(44)v</i>	lincosamid, makrolid, streptogramin
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>erm(44)v</i>	lincosamid, makrolid, streptogramin
<i>Streptococcus suis</i>	<i>lsaE</i>	lincosamid, makrolid, oxazolidinon, fenikol, pleuromutilin, streptogramin, tetraciklin
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	aminoglikozid
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	aminoglikozid

Két profághoz kapcsolt ARG-t azonosítottunk, a VirSorter2 által a *Staphylococcus pseudoxylosus*hoz sorolt *erm(44)v*-t tartalmazó kontigot dsDNS-fág eredetűnek találtuk, míg a *Streptococcus suis*ből származó *lsaE* kontigot ssDNS-származéknak prediktáltuk. Ezeket a fághoz kapcsolódó ARG-eket a 37., illetve a 45. mintában mutattuk ki.

Az ARG-eket tartalmazó kontigokat 19 mintában találtuk plazmidokhoz tartozónak (11, 12, 17, 30, 32, 36, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 számú minták).

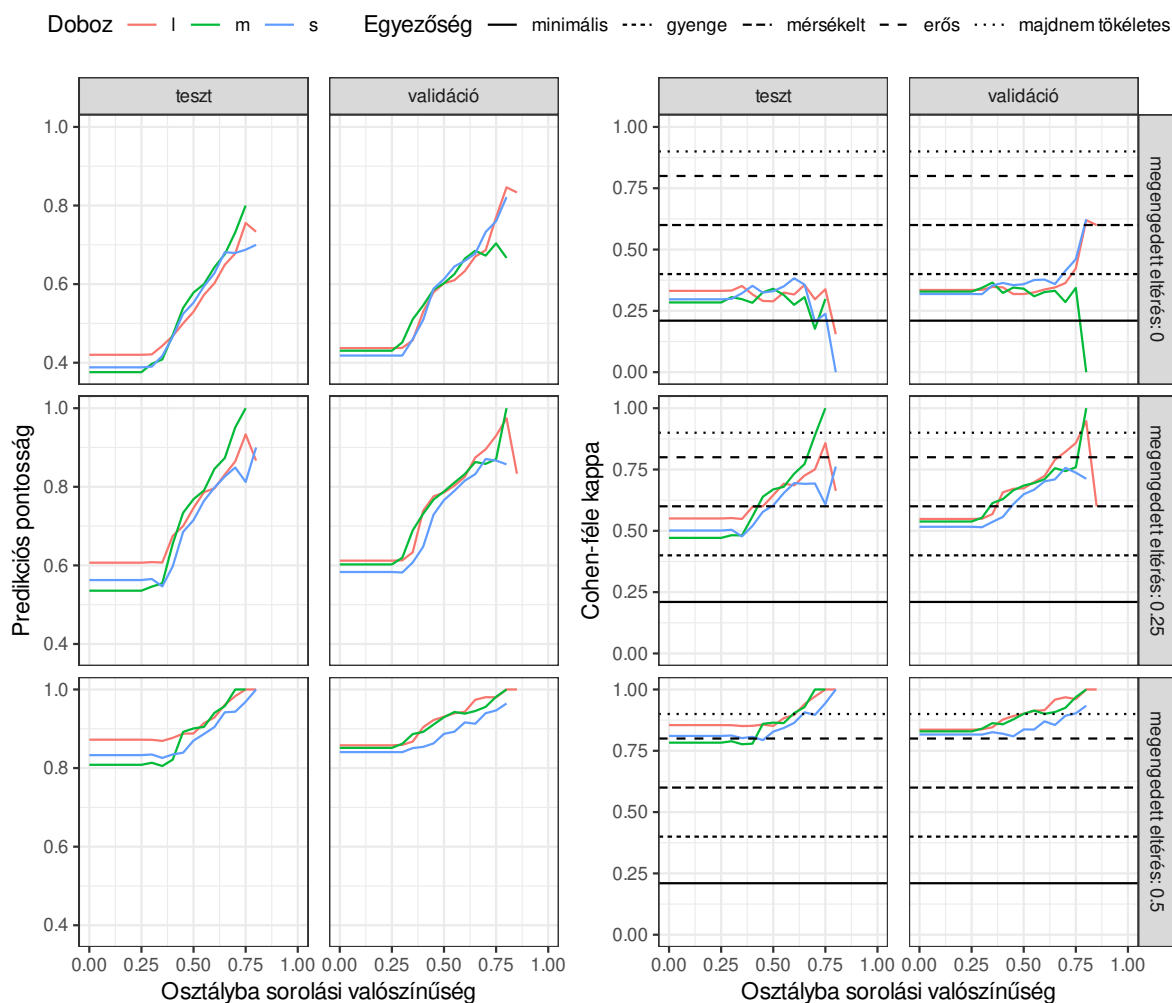


6.3. ábra. Mobil antimikrobiális rezisztencia-gének gyakorisága a származási baktériumok szerint. A pontok mérete jelzi az integratív mobil genetikai elemmel (iMGE) ellátott, valamint a plazmidban vagy fágban elhelyezkedő antimikrobiális rezisztencia-gének előfordulási gyakoriságát.

6.2. Tejelő tehének kondíciópont-predikciójának pontossága

6.2.1. Predikció 12 BCS osztállyal

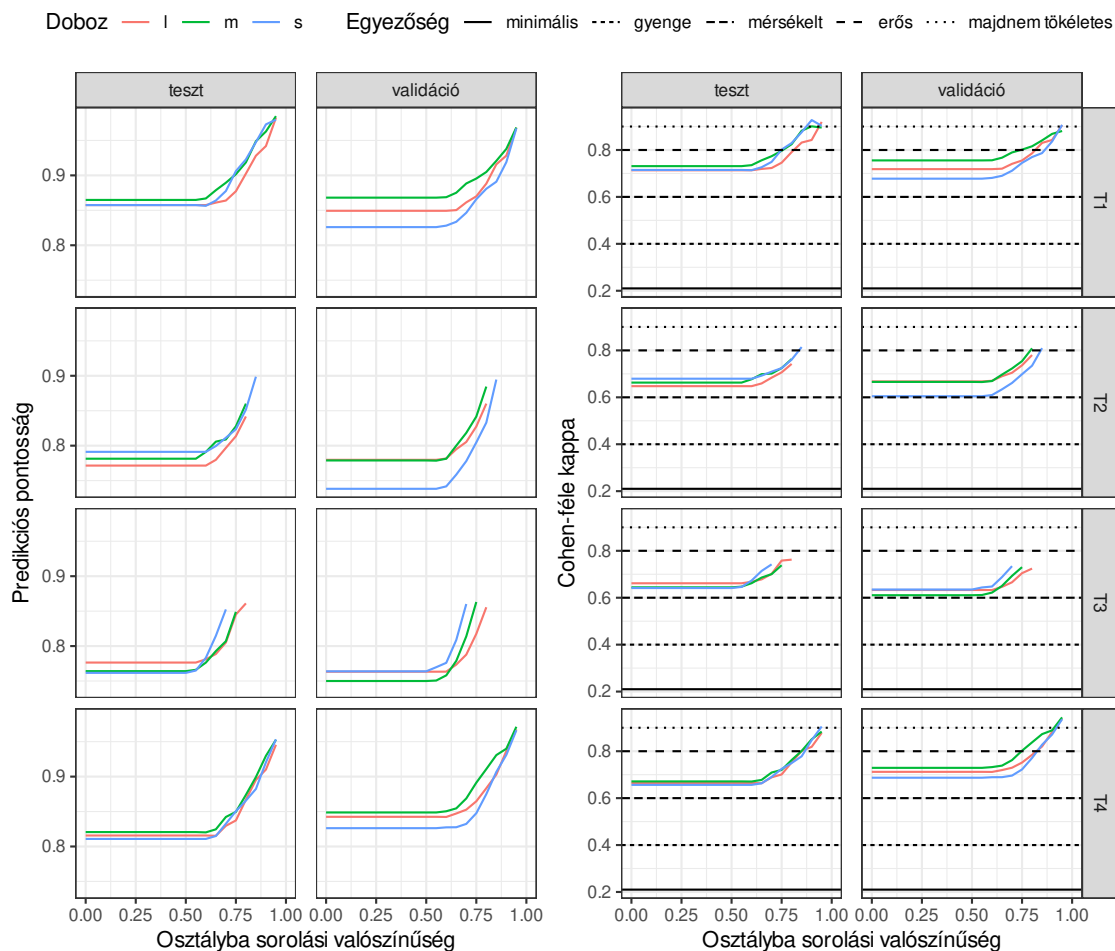
A 12 osztállyal végzett tanítás alapján a 12 osztályra vonatkozó predikciók minősége a 6.4. ábrán látható. Az x -tengelyen a predikciók osztályba sorolási valószínűségeit láthatjuk. A küszöbértékek növekedését csak az egyre magasabb pontossággal besorolt képekkel tudjuk elérni. Ez egyben azt is jelenti, hogy a Cohen-féle kappa és a predikciós pontosság értékeinek javulásával csökken azon képek száma, amit a modell osztályozni tud. Az egyes ábrák x -tengelyén végighaladva képet kaphatunk arról, hogy az osztályba sorolási valószínűség hogyan befolyásolja az osztályba sorolás pontosságát. Az alacsony megbízhatósággal prediktált osztályok besorolási hibája nagyobb, míg a magas megbízhatóságú képeket jobban osztályozta a modell. A 12 osztállyal történő tanítás és értékelés során, 0 hibatartományt megengedve a Cohen-féle kappa érték a teszhalmazon minimális egyezést ért el. A Cohen-féle kappa érték rohamosan romlott 75%-os osztályba sorolási valószínűség felett. A validációs halmaz esetében az egyezés hasonló volt a 75%-os osztályba sorolási valószínűség alatt. Ezzel szemben e szint felett az egyezés gyenge volt az l és s dobozok esetében, és még a minimálisnál is gyengébb volt az m doboz esetében. Ha 0,25-ös hibatartományt engedtünk meg, akkor mind a teszt-, mind a validációs halmazon 50%-os predikciós valószínűség alatt minimális egyezést kaptunk, e fölött pedig a képek a gyenge egyezés tartományába estek. Ha 0,5 hibatartományt engedtünk meg, akkor a görbék az erős határvonal felett vagy annak közelében futottak, és az osztályok predikciós valószínűsége mind a teszt-, mind a validációs halmazon 60% körül volt. A 65% és 70% közötti tartományban azonban szinte tökéletes egyezést találtunk.



6.4. ábra. 12 BCS-osztállyal betanított és kiértékelt modell. A predikció megbízhatósági értékeit (predikciós pontosság és Cohen-féle kappá) a teszt- és validációs halmazokon becsültük a prediktált osztály valószínűségének függvényében. Három hibatarományt (0, 0,25 és 0,5) vizsgáltunk az általam adott és a prediktált pontszámok egyezése elemzéséhez. A vízszintes vonalak a McHugh (2012) által megállapított küszöbértékeket jelölik, melyek a Cohen-féle kappá értékek értelmezését segítik.

6.2.2. Predikció három BCS-osztállyal

A 6.5. ábra a 12 BCS-osztály helyett csak 3 BCS-osztályra készített predikciók minőségét mutatja. A három osztályt az 5.3. táblázatban bemutatott négy céltartomány (T1–T4) szerint hoztuk létre. A képekhez rendelt szakértői pontszámokat a három BCS-osztály valamelyikébe soroltuk be. Ezt az osztályozást használtuk a tanításhoz. A predikciót is három osztályra készítettük el. Ebben a háromosztályos rendszerben a modell jó minőségű predikciókat készített. Ez a modell a T2 és T3 célintervallum esetén gyengébb kezdeti predikciós pontosságot mutatott, mint T1 és T4 típusú osztályozással. Azonban az osztályba sorolás valószínűségének növelésével minden osztályozási módszer esetében javult a predikciós pontosság. Ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk a Cohen-féle kappá esetében is.

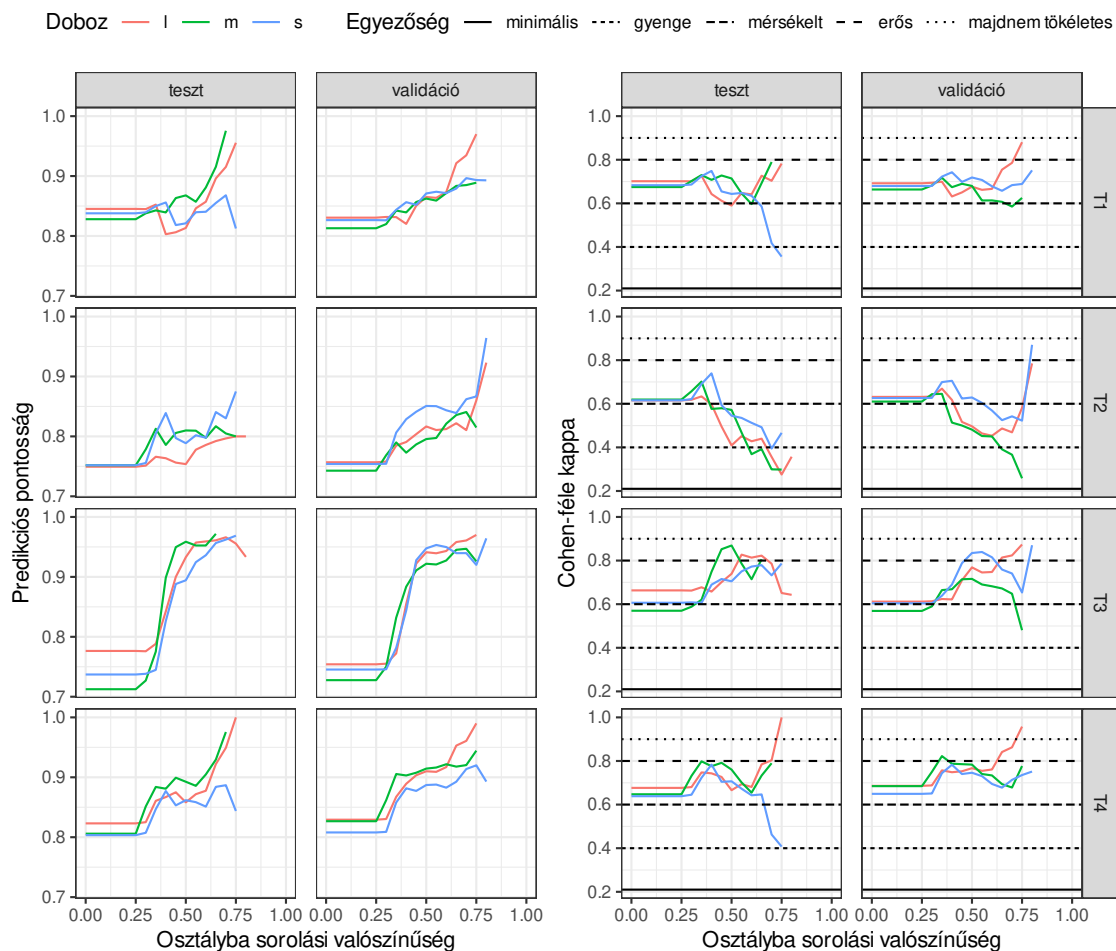


6.5. ábra. Három BCS-osztállyal betanított és kiértékelt modell. A predikció megbízhatósági értékeit (predikciós pontosság és Cohen-féle kappá) a teszt- és validációs halmazokon becsültük a prediktált osztály valószínűségének függvényében. A vízszintes vonalak McHugh (2012) által megállapított küszöbértékeket jelölik a Cohen-féle kappá értékek értelmezéséhez.

6.2.3. 12 osztályos tanítás és a tesztalmaz T1–4 osztályba való átcímkezése utáni tesztelés

Egy második „kontroll” megközelítésben a hálózatot 12 BCS osztályon tanítottunk, és 12 osztályt prediktáltunk (6.4. ábra). Ezután a 12 osztályt átosztályoztuk a 3 BCS-osztályba. Ezt megismételtük minden egyes célintervallum (T1–4 rendszer) esetében is. Ezek az eredmények a 6.6. ábrán láthatók.

A tesztkészleten belül mind a T1, mind a T2 céltartományok esetében a Cohen-féle kappá és a pontosság valamivel magasabb a 3 osztállyal tanított hálózatok esetében, mint a 12 osztállyal tanítottaknál. A T3 és T4 tartományoknál ennek az ellenkezője figyelhető meg. A Cohen-féle kappá ugyanazt a tendenciát mutatja, azzal a különbséggel, hogy a T4-es céltartomány vonatkozásában az *s* doboz magasabb értéket ér el, mint a 3 osztály által tanított hálózattal. A validációs halmazon belül a 12 osztállyal tanított modell predikciós pontossága általában magasabb volt. Kivételt képez az *m* doboz a T1 és T2 céltartományok esetében. Az összes céltartományt figyelembe véve az *s* doboz magasabb Cohen-féle kappát eredményezett a 12

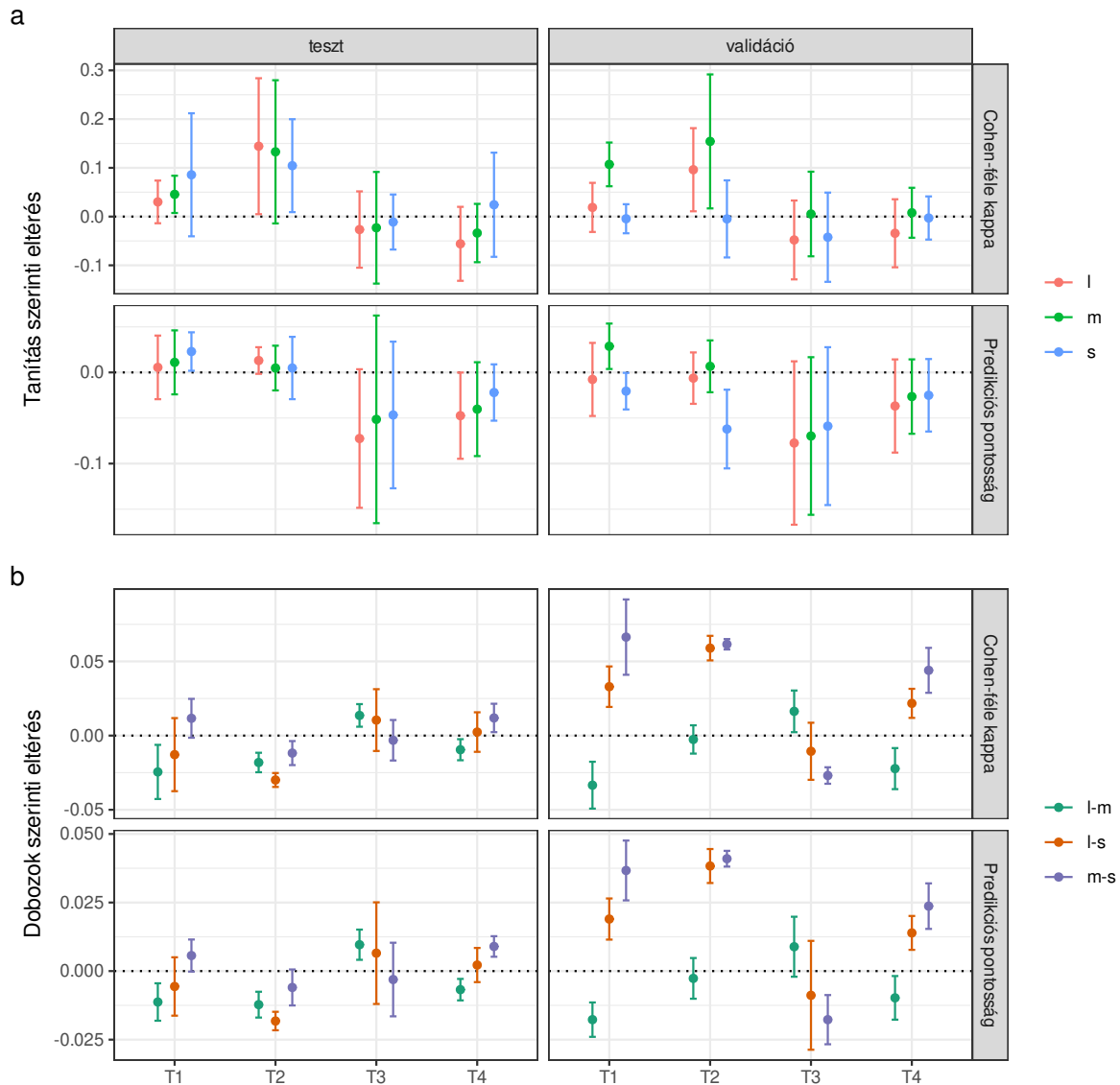


6.6. ábra. 12 BCS-osztállyal tanított és hárommal kiértékelt modell. A predikció megbízhatósági értékeit (pontosság és Cohen-féle kappá) a teszt- és validációs halmazokon becsültük a prediktált osztály valószínűségének függvényében. A vízszintes vonalak a McHugh (2012) által meghatározott küszöbértékeket jelölik a Cohen-féle kappá értékek értelmezéséhez.

osztály által tanított hálózatokhoz képest. A T1 és T2 céltartományokban az *l* doboz magasabb Cohen-féle kappát eredményezett a 3 osztályos rendszerben tanított hálózatoknál, míg a T3 és T4 céltartományokban alacsonyabb Cohen-féle kappá érhető el. Az *m* doboz Cohen-féle kappá értékei minden céltartományban magasabbak voltak a 3 osztály által tanított CNN-ek esetében.

A két megközelítés további összehasonlítása érdekében megvizsgáltuk a Cohen-féle kappá és a predikciós pontosság értékek különbségét az azonos osztályba sorolási valószínűségekre vonatkozóan. Ehhez kivontuk a 12 osztályra tanított halmaz értékeit a 3 osztályra tanított halmaz értékeiből. A 6.7. ábrán a különbségek átlagát és szórását ábrázoljuk.

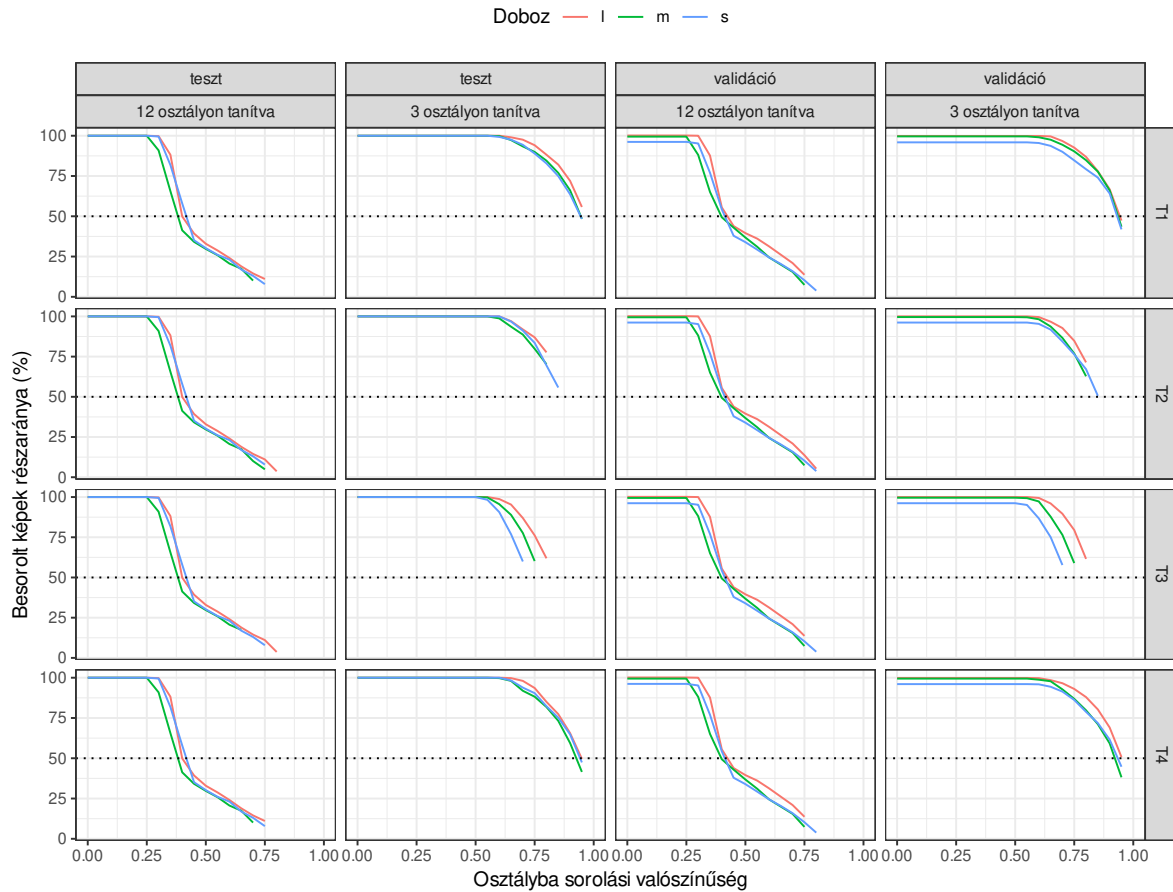
A három osztállyal tanított hálózatok annotációs dobozainak predikciós pontosságát a 6.7. ábra b alábrája foglalja össze. A különböző dobozméretes esetekben a különböző céltartományokban ugyanazokat a tendenciákat figyelhetjük meg a predikciós pontosság és a Cohen-féle kappá tekintetében. Az is látható, hogy a dobozok közötti különbségek egy nagyságrenddel kisebbek voltak, mint a 12 és a 3 osztály által tanított hálózatokból kapott különbségek. A teszt-halmaz alapján a céltartományok esetében a dobozonkénti predikciós pontosság csökkenő sorrend-



6.7. ábra. A predikció pontosságának változékonyságát az átlag és a szórás mutatja. Az a. alábra a 3 és 12 osztályos tanításon alapuló predikciók közötti különbséget mutatja. A b. alábra a 3 osztályos tanítás alapján kapott predikációs pontosság dobozméretek közötti különbségeit foglalja össze.

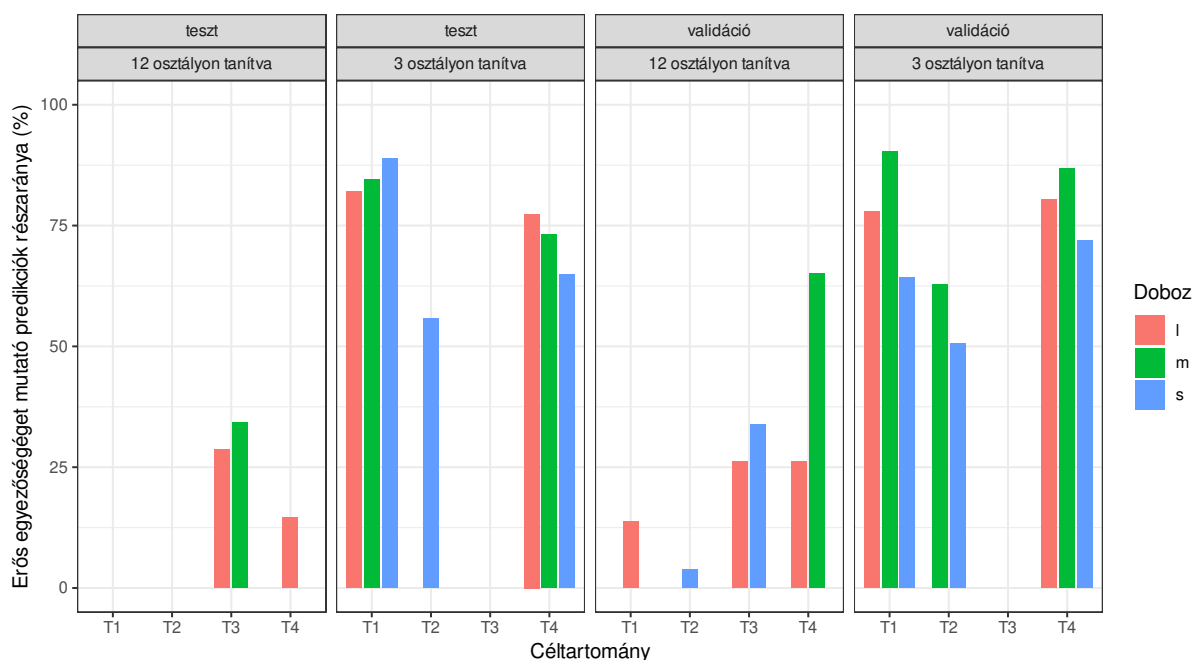
ben a következőképpen alakult: T1: m, s, l ; T2: s, m, l ; T3: l, s, m ; T4: m, l, s . Míg a validációs halmazban a céltartományok esetében a dobozonkénti predikációs pontosság csökkenő sorrendben a következő volt: T1: m, l, s ; T2: m, l, s ; T3: s, l, m ; T4: m, l, s .

Ahogy az egyes eredményeknél az x -tengelyen haladva nő az osztályba sorolási valószínűség, azzal párhuzamosan egyre kevesebb képre tud a modell BCS-osztályt prediktálni. A 6.8. ábrán láthatjuk, hogy a predikációs megbízhatóság függvényében hogyan csökken a használható képek részaránya. A 12 osztállyal tanított neurális hálózatok esetében 40%-os predikációs valószínűségnél a képek felére már tudott predikációt készíteni a modell. A 3 osztállyal tanított hálózatok esetében azonban még a legmagasabb prediktált osztályba sorolási valószínűségnél is a képek fele, vagy valamivel kevesebb, mint a fele még mindig az elemzés részét képezte.



6.8. ábra. A besorolt képek aránya. Ahogy a küszöbérték egyre szigorúbb, úgy csökken a megmaradt képek száma. A csökkenést nagyobb mértékben a 12 osztályos tanításnál figyelhetjük meg. Ez betekintést nyújt a képek eloszlásába a döntési határ tekintetében.

A céltartománytól (T1–T4) függetlenül a három osztályon betanított és kiértékelt megközelítés Cohen-féle kappa értékei azt mutatták, hogy minden állatot legalább közepes egyezéssel tudtunk BCS-kategóriákba sorolni. A 6.9. ábra a különböző céltartományokra különböző dobozméretekkel végzett tanítás alapján készült predikciók arányát mutatja, amelyek legalább erős egyezést eredményeztek. A 3 osztályon tanított és tesztelt modell esetében az erős egyezést mutató predikciók aránya sokkal magasabb, mint a 12 osztályon tanított és tesztelt modellnél (6.9. ábra).



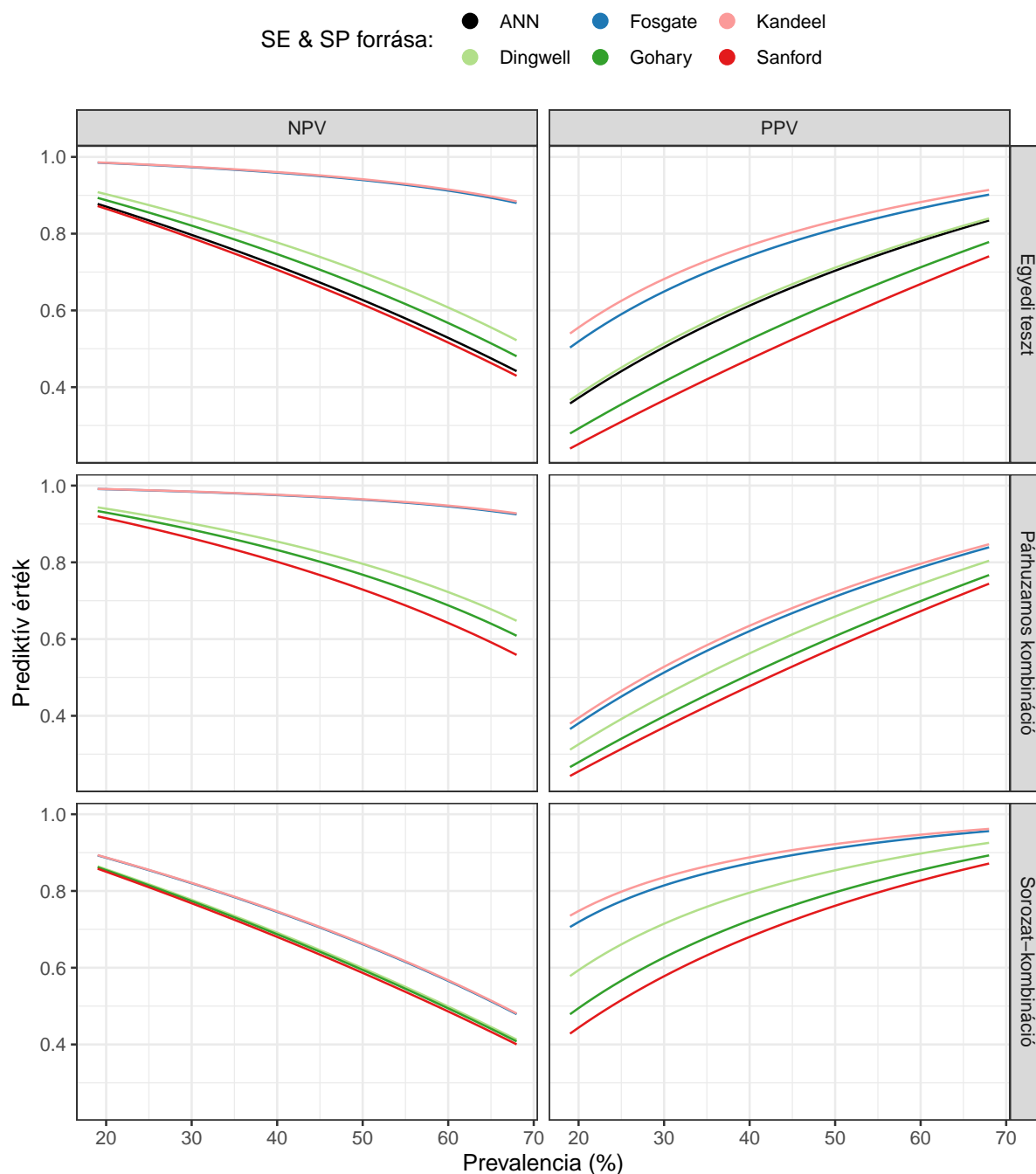
6.9. ábra. Az erős egyezést mutató predikciók aránya (Cohen-féle kappa ≥ 0.8). Különböző céltartományokra (T1–T4) vonatkozóan. A három BCS osztályon tanított CNN-ek feltűnően nagyobb arányban mutattak erős egyezést, mint a 12 osztályon tanított, majd átminősített CNN-ek.

6.3. Szomatikussejtszám-növekedés predikciójának pontossága

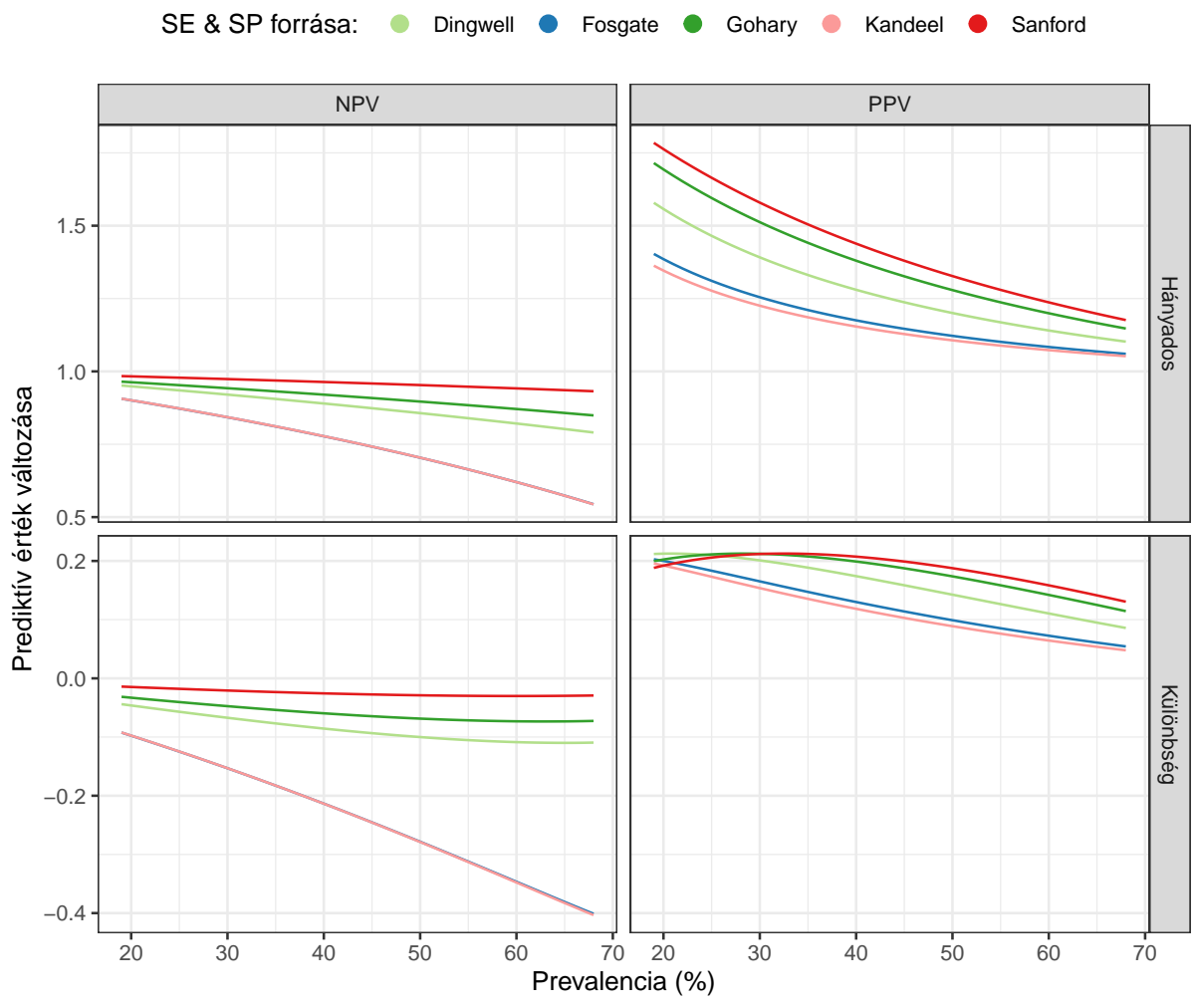
A különböző felépítésű, megvizsgált ANN-ek közül a tesztalmazon a legnagyobb F1-értéket (0,42) adó modell egy 1 rejtett rétegben 384 neuront tartalmazó modell volt. Ezzel a neurális hálózattal a tesztalmazon végzett predikciókat összevetve a ground truth-szal az $SE_{ANN} = 0,54$, az $SP_{ANN} = 0,77$ volt, a továbbiakban az ezzel a modellel kapott eredményeket mutatjuk be.

Az egyes tesztekhez (ANN és CMT) tartozó szenzitivitás és specificitásértékekkel, valamint a prevalenciaértékekkel becsült prediktív értékeket mutatja be a 6.10. ábra felső sora. Ezen becslések mediánját csökkenő sorrendbe állítva az ANN a 6. lett az NPV, és 4. a PPV sorban. Mindegyik alábrán megfigyelhető az az ismert jelenség, hogy a prevalencia növekedésével az NPV csökken, míg a PPV növekszik. A 6.10. ábra második és harmadik sorában ábrázolt predikciós görbék azt mutatják, hogy az ANN és CMT párhuzamos kombinációja az NPV, míg a sorozatszerű kombinációja a PPV értékek javulását eredményezte.

A 6.11. ábrán összefoglaltuk, hogy az ANN és CMT sorozatban való kombinációjával kapott predikciós értékek milyen változást eredményeznek az individuális CMT alapú predikciókhoz képest. Az ábráról többek között leolvasható, hogy különösen az alacsony prevalenciák esetén, az ANN+CMT kombináció jelentősen növeli a pozitív predikció megbízhatóságát. A sorozatkombináció az individuális CMT-hez képest a 20%-os prevalenciánál 55%-os, a 30%-os prevalenciánál 39%-os PPV emelkedést eredményezett.



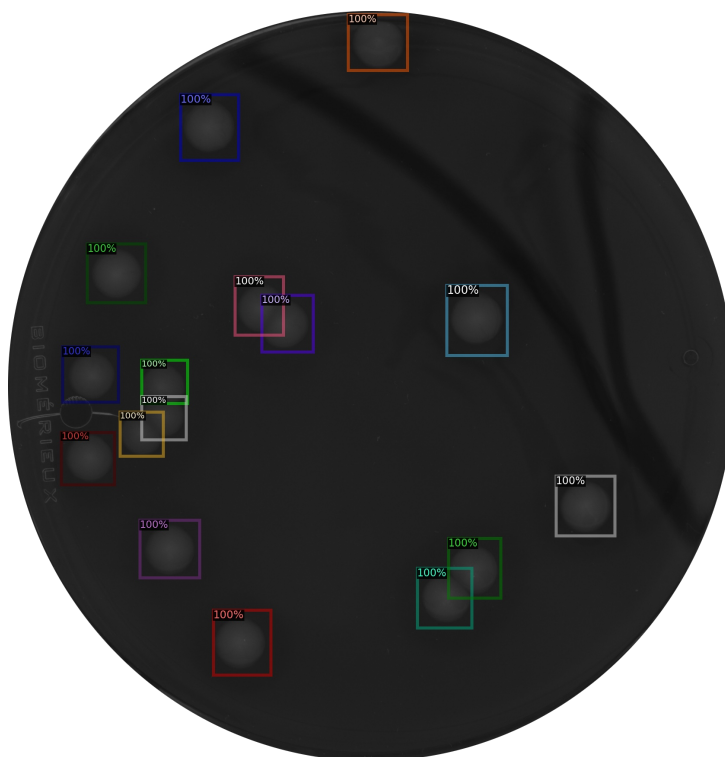
6.10. ábra. Prediktív értékek. A One test sorban láthatjuk az egyedi tesztek (ANN és CMT) szenzitivitás és specifititás értékeivel a különböző prevalenciákra becsült negatív (NPV) és pozitív (PPV) prediktív értékeket. A második sorban a párhuzamosan, a harmadikban a sorozatban kombinált tesztek (ANN+CMT) klasszifikációs hibáját felhasználva becsült prediktív értékeket láthatjuk.



6.11. ábra. A sorozatkombinációval elérhető változások. A különbség sorban a sorozatban kombinált (ANN+CMT) tesztek prediktív értékéből kivont egyedi CMT tesztek prediktívérték különbsége látható. A hányados sorban a sorozatban kombinált (ANN+CMT) tesztek prediktív értékét az egyedi CMT tesztek prediktívértével kapott hányados látható.

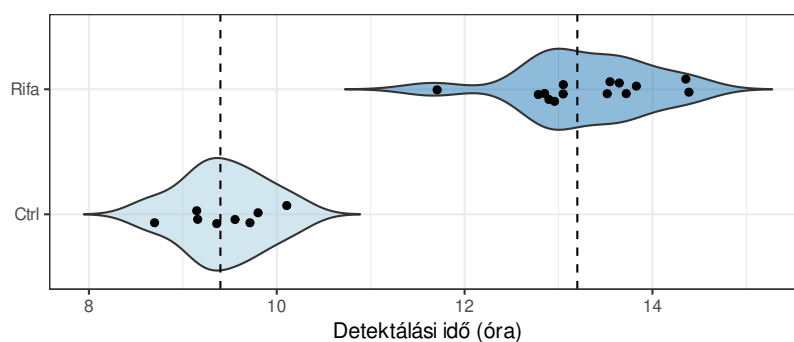
6.4. Baktériumtelepek növekedésének becslési pontossága

A betanított neurális hálózat, függetlenül a telepek számától, egy tenyészetről készült felvételt 0,31 másodperc alatt dolgozott fel. Ebben az időben benne volt a felvételek egységes méretre történő konvertálása, a telepek határoló dobozának predikciója, illetve az azokat leíró adatok táblázatba rendezése. A Ctrl_1 tenyészet egy tetszőleges képére prediktált határoló dobozok láthatók a 6.12. ábrán.



6.12. ábra. A neurális hálózat által prediktált határoló dobozok a Ctrl_1 tenyészet egyik képén. A színeknek nincs jelentése, csak az elkülönítést segíti átfedő dobozok esetén. A százalékek azt jelzik, hogy az algoritmus milyen megbízhatóságot rendelt a detektált objektumhoz.

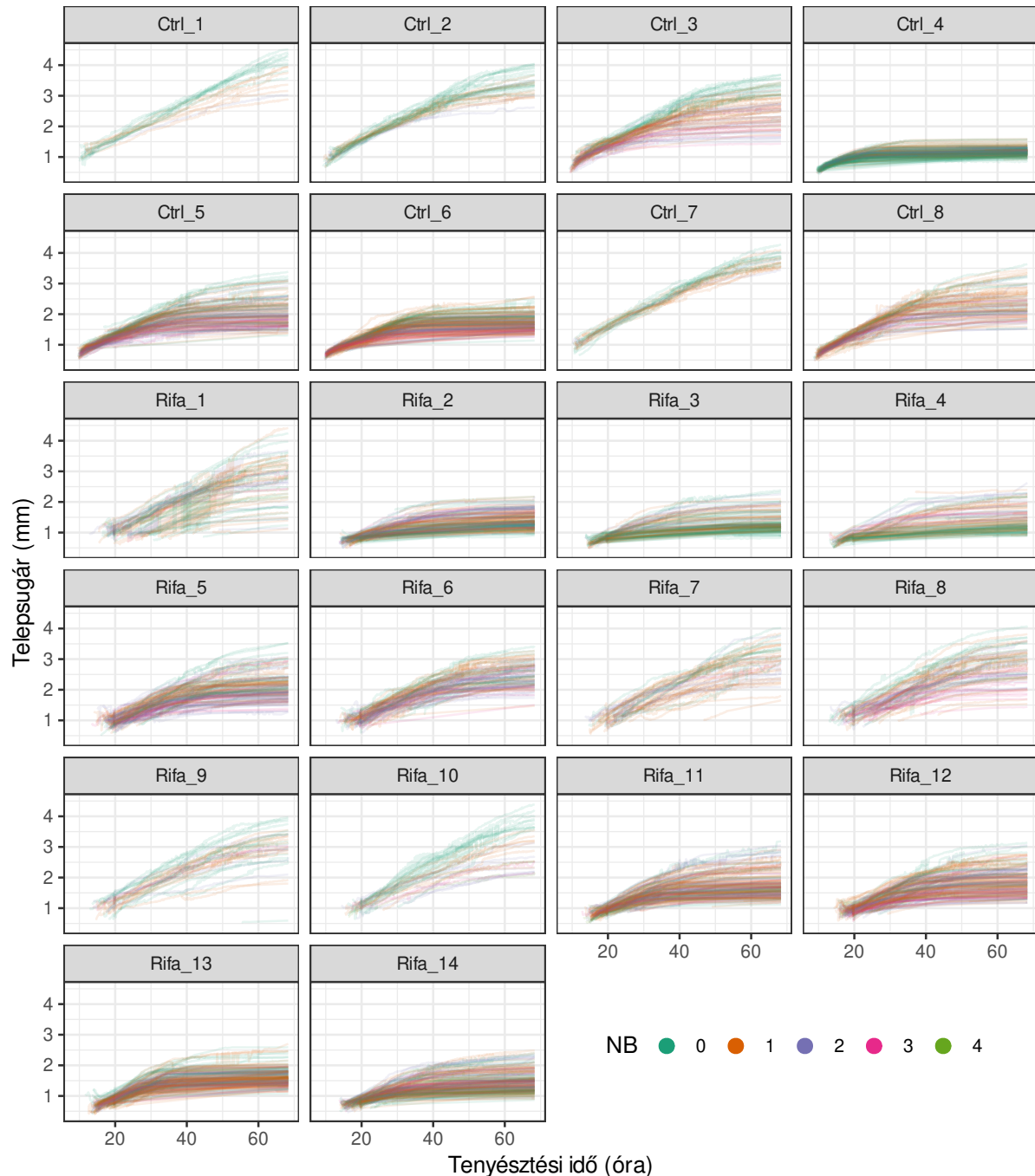
Az egyes tenyészeteken az első telepek detektálásának időpontját mutatja a 6.13. ábra. Míg a Ctrl csoportban az első telepek detektálási idejének mediánja 9,4 óra, addig a Rifa csoportban 13,2 óra, különbségük 3,8 óra volt.



6.13. ábra. A tenyészetenkénti első telepek detektálásának időpontja csoportonként. A szaggatott vonalak a csoportok mediánját jelzik.

A telepek növekedési görbéje a 6.14. ábrán látható. Követve Bär és mtsai. (2020) megközelítését tenyészetenként becsültük a lineáris növekedési trendet az első 24 órára (6.2. táblázat). A 150 telepnél kevesebb telepet tartalmazó Ctrl tenyészetekre vonatkozó átlagos növekedési sebesség $60,3 \mu\text{m}/\text{h}$ (SD: 5,6).

Mixed effect modellt alkalmazva a Ctrl és Rifa csoportokra vonatkozó telepsugár növekedési sebességi becsléseket a 6.2. táblázatban foglaltuk össze.



6.14. ábra. Telepnövekedési görbék. Egy görbe egy követett telep (6.2. táblázat KT oszlopa jelzi ezek számát) sugárméretének változását írja le. A színezésük azt jelzi, hogy a telepnek hány olyan szomszédja (NB) van, amelynek a határoló dobozával a telep határoló doboza átfed.

6.2. táblázat. A baktériumtelepek sugarának óránkénti növekedési mértéke az első 24 órában. Az A. táblázatban tenyészetenként lineáris regresszióval becsült értékek láthatók. A plate azonosítók, a Bär és mtsai. (2020) által a Figshare-en elhelyezett digitális képeket tartalmazó könyvtár nevéből származnak, a KT oszlopban a követett telepek számát, az ID oszlopban a Bär és mtsai. (2020) tenyészetazonosítói, az N oszlopban a tenyészetenkénti telepszámot láthatjuk. A B. táblázatban mixed effect lineáris regresszióval a kezelési csoportokon belüli sugárnövekedési becsléseket láthatjuk. Az NB oszlop további csoportokat jelez, az érték nélkül álló sorban az összes telepre vonatkozó becsléseket olvashatjuk, a további számok azt jelzik, hogy a telepeknek hány olyan szomszédjuk van, amelyek határoló dobozával átfed a sajátja.

A)

Tenyészet	KT	Becslés ($\mu\text{m}/\text{h}$)	SE	Bär és mtsai. (2020) ID	N
Ctrl_1	16	55,3	0,84	21	16
Ctrl_2	31	66,3	0,51	22	31
Ctrl_3	76	56,8	0,45	20	78
Ctrl_4	200	36,4	0,28	19	1 186
Ctrl_5	134	50,6	0,29	18	162
Ctrl_6	180	44,2	0,25	15	275
Ctrl_7	22	66,6	0,71	16	23
Ctrl_8	90	56,7	0,33	17	102
Rifa_1	54	16,3	2,52	5	71
Rifa_2	214	33,8	0,70	6	925
Rifa_3	165	42,4	0,73	7	1 200
Rifa_4	153	41,2	0,95	8	1 509
Rifa_5	136	23,2	1,45	10	158
Rifa_6	91	31,6	1,29	9	93
Rifa_7	43	37,6	2,30	11	44
Rifa_8	68	34,3	1,86	12	76
Rifa_9	36	40,4	2,15	13	40
Rifa_10	29	46,8	2,20	14	33
Rifa_11	181	40,6	0,67	1	288
Rifa_12	166	29,3	1,01	2	207
Rifa_13	206	44,4	0,59	3	425
Rifa_14	215	33,1	0,61	4	662

B)

Csoport	KT	NB	Összes tenyészet Becslés ($\mu\text{m}/\text{h}$)	SE	KT	N<150 tenyészet Becslés ($\mu\text{m}/\text{h}$)	SE
Ctrl	749		51,0	0,14	235	58,7	0,22
	233	0	53,1	0,28	66	65,0	0,42
	277	1	52,9	0,23	99	58,9	0,34
	177	2	48,2	0,23	52	53,0	0,40
	55	3	43,2	0,35	15	51,4	0,65
	7	4	48,2	0,75	3	55,6	0,77
	Rifa	1757		36,5	0,29	321	33,9
	490	0	35,2	0,65	87	37,3	1,60
	665	1	38,6	0,43	119	42,4	1,31
	432	2	37,0	0,55	80	28,8	1,50
	139	3	36,1	0,76	31	31,0	1,82
	31	4	35,4	1,66	4	26,3	5,76

7. Megbeszélés

7.1. Antimikrobiális rezisztencia-gének szilázsban

7.1.1. Bakteriom

Vizsgálatunk során számos tökéletes ARG-egyezeit azonosítottunk a *Medicago* szilázsmin-ták metagenomjaiban. Az A csoport kivételével az elemzett részhalmazok mindegyikében volt legalább egy minta, ami egy vagy több ARG-t tartalmazott. A PRJNA495415 mintái közül az ARG-k száma a D csoportban volt a legmagasabb. Ennek a megállapításnak az értelmezése nehézségbe ütközik a mintákra vonatkozó részletes információk hiánya miatt. Érdekes mó-don a PRJNA764355 mintái közül egy kivételével mindegyik tartalmazott ARG-eket. Azonban a metaadatok szűkössége itt is gátat szab a jelenség tágabb értelmezésének. Mégis egy lehet-séges oka az lehet, hogy a PRJNA764355 mintákat mélyebben szekvenálták, és így körülbelül 1,3-szor több readet tartalmazott, mint a PRJNA495415 minták. Ismert korábbi tanulmányok-ból, hogy a mélyebb szekvenálás teljesebb szekvenálást eredményez gének *de novo* össze-állításával (Sims és mtsai. 2014; Tóth és mtsai. 2020b). A következőkben eredményeinket a bakteriológiai- és genomikai jelentőségük, valamint az antimikrobiális kezelés és a lehetséges klinikai szempontok alapján értelmezzük.

Az azonosított ARG-eket hordozó baktériumok a szilázsban való jelenlétük alapján osztályoz-hatók. A szakirodalomban a következő baktériumokat tekintik szilázásra jellemzőnek az álta-lunk detektáltak közül: *B. subtilis* (McAllister és mtsai. 2018), *E. faecium* (Y. Li, Nishino, 2011), *Escherichia coli* (Ogunade és mtsai. 2018), *L. plantarum* (S. Zhao és mtsai. 2020), *Lactococ-cus lactis* (Khota és mtsai. 2016), *Lactobacillus brevis* (Feyereisen és mtsai. 2019; Paradhita és mtsai. 2020; Xu és mtsai. 2017), *Ligilactobacillus acidiphiscis* (Khota és mtsai. 2016), *Weis-sella paramesenteroides* (Björkroth és mtsai. 2002). E fajok nemzetségei uralják a mintáink bakteriomiáját. Az azonosított *Cronobacter* sp. JZ38 (Eida és mtsai. 2020) növényi eredetű lehet. Feltételezhető azonban, hogy más fajok is jelen lehetnek a szilázsban szennyeződésként: *Amy-lolactobacillus amylophilus*, *E. hormaechei*, *Enterococcus faecalis*, *Gracilibacillus* sp. SCU50, *Lactobacillus manihotivorans*, *L. paracasei*, *Providencia rettgeri*, *Staphylococcus aureus*, *Sta-phylococcus carnosus*, *S. pseudoxylus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. suis*, *Tetrageno-coccus halophilus*. Mindazonáltal e baktériumok némelyike a *Lactobacillaceae* család, a *Leuco-nostoc* vagy az *Enterobacter* nemzetségekhez tartoznak, mely csoportok számos faja jellemző a szilázstól eltérő, erjesztett élelmiszer- és takarmánykomponensekre.

7.1.2. Rezisztom

Genomikai szempontból az alábbiakat találtuk a szakirodalomban a vizsgálatunkban azono-sított ARG-k és az azokat hordozó baktériumok együttes előfordulását illetően. Az *aadA2*-t, amely egy aminoglikozid nukleotidil-transzferázt kódol, korábbi publikációkban már leírták az *Acinetobacter baumanniban* (Chen és mtsai. 2015; Mak és mtsai. 2009).

Az *ant(6)-Ia*, ami szintén egy aminoglikozid nukleotidil-transzferáz gén, amely számos fajban, többek között a *Lactobacillus* spp. jelenik meg (Dec és mtsai. 2018). Az *A. amylophilus*hoz való fajspecifikus társulását korábbi publikációkban nem írták le.

Az *aph(3')-IIa*, egy aminoglikozid foszfotransferáz (Jia és mtsai. 2017), amit a mi ismereteink szerint *B. subtilis*ben eddig nem mutattak ki.

A kinolon-rezisztencia fehérjét kódoló *QnrS1* eredetileg a *Shigella flexneri*ben azonosították (Hata és mtsai. 2005). Eredményeinkkel összhangban *Cronobacter* spp.-ben is megjelent ez a gén egy a közelmúltban publikált esettanulmány szerint (Lachowska és mtsai. 2021).

*E. hormaechei*ből származó *aadA2*-t és *sul1*-t, ami egy szulfonamidrezisztens dihidropteroát-szintáz gén, kimutatták már Gram-negatív baktériumok genomjában, például *Enterobacter* spp. és *E. hormaechei* esetében (Du és mtsai. 2017; Indugu és mtsai. 2020).

Az *Enterococcus* nemzetségen belül két tökéletes ARG egyezést azonosítottunk, nevezetesen az *aph(3')-IIIa* az *E. faecalis*ban és a *poxtA* az *E. faecium*ban. Az *aph(3')-IIIa* egy aminoglikozid-foszfotransferáz, amely rendszerint *S. aureus*ban és *Enterococcus* fajokban fordul elő (Woegerbauer és mtsai. 2015). Míg a *poxtA* egy ABC-F alcsaládba tartozó (ATP-kötő kazetta-F) fehérjét kódoló gén, amely megkönnyíti tetraciklinnel, fenikollal és oxazolidinonnal szembeni rezisztencia kialakulását a bakteriális riboszóma módosításával. A *poxtA* gént először egy meticillin-rezisztens *S. aureus* törzsben találták meg, amelyet más baktériumfajok, köztük az *E. faecium* (Na és mtsai. 2020) követtek.

A *Sul2*, a Gram-negatív baktériumok szulfonamidrezisztens dihidropteroát-szintáza melyet gyakran írnak le *E. coli*ban (Hammerum és mtsai. 2006; Jia és mtsai. 2017).

A *DfrG* egy plazmidon kódolt dihidrofolát reduktáz (Jia és mtsai. 2017), amelyet tudomásunk szerint eddig még nem írtak le *Gracibacillus* spp.-ben, de már megjelent a *Bacillaceae* családban (Noor Uddin és mtsai. 2015).

Az *ant(6)-Ia*, egy aminoglikozid nukleotidil-transferáz gén, mely számos baktériumban jelenik meg, a *Lactobacillus* fajokat beleértve (Dec és mtsai. 2018). A *L. manihotivorans*hoz való fajspecifikus társulását egyetlen publikációban sem írták le.

A *PoxA* gén, amelyet a szilázminták *L. paracasei*, *L. plantarum* és *L. brevis* fajaiban találtunk, a korábbi szakirodalmi leírások szerint megjelenik a *Lactobacillaceae* családban, nevezetesen a *Lactobacillus acidophilus*ban, de nem pont ezekben a fajokban (Huang és mtsai. 2021).

Egy másik faj, amely a szilázmintákban *aph(3')-IIIa*-t tartalmazott, a *L. plantarum* volt. Ez a megállapítás összhangban van a korábbi publikációkban leírt ARG-baktérium párosításokkal (Rojo-Bezares és mtsai. 2006).

Továbbá a *L. plantarum* a *vatE*-hez is társult, ami egy sztreptograminokkal szembeni rezisztenciát biztosító acetiltransferázt kódol (Jia és mtsai. 2017). A *vatE*-t eredetileg *E. faecium*ban (Jia és mtsai. 2017) találták meg, majd azóta azonosították *Lactobacillaceae* fajokban (Bischoff és mtsai. 2007), de nem specifikusan a *L. plantarum*ban.

A *L. acidiphiscis*ben talált *ant(9)-Ia*-t, ami egy aminoglikozid nukleotidil-transferáz gén (Jia és mtsai. 2017), ebben a tanulmányban elsőként társítottuk ehhez a nemzetséghez.

A *qnrD1* gén, amely egy kinolonrezisztencia-fehérjét kódol, általában *Salmonella entericá*ban észlelhető (Jia és mtsai. 2017), továbbá leírták már *Providencia* fajokban is (Mao és mtsai. 2018). Mi *P. rettgeri*ben tudtuk detektálni.

A *S. aureus* két ARG-vel is rendelkezik, amely egy tetraciklin efflux fehérjét kódol, az *ant(6)-Ia*-val és a *tetK*-val. Mindkettő gyakori *Staphylococcus* fajokban (Hauschild és mtsai. 2008; Trzcinski és mtsai. 2000).

Az *erm(44)v*-t először *S. saprophyticus*ban mutatták ki (Strauss és mtsai. 2016), nem találtunk szakirodalmat e gén megjelenéséről *S. carnosus* vagy *S. pseudoxylosus* fajokban.

Az *IsaE*, amely egy másik ABC-F alcsaládba tartozó, pleuromutilinnel, lincosamiddal és streptogramin A-val szembeni rezisztenciát biztosító fehérjét kódol, gyakori lelet *Streptococcus* fajokban (Malbruny és mtsai. 2011), így *S. suis*szal is összefüggésbe hozható (Nicholson és mtsai. 2021).

A korább említett baktériumfajokon kívül az *aph(3')-IIIa* gén *T. halophilus*ban is kimutatható volt. Ez az ARG gyakran jelenik meg az *Enterococcaceae* családnhoz tartozó fajokban (Jia és mtsai. 2017), de ennél a fajnál még nem írták le.

Továbbá, tudomásunk szerint a *W. paramesenteroides*hez társult *ant(6)-Ia* génről is ebben a tanulmányban értekeztünk először.

7.1.3. Mobilom

Vizsgálatunkban a predikció során több ARG esetében jutottunk arra, hogy mobilitást elősegítő genetikai elemekkel együtt fordul elő. A mobilitás jellemzőinek bioinformatikai elemzése három fő mobilitást meghatározó csoport, nevezetesen iMGE-k, fágok és plazmidok azonosításán alapult.

Integrált mobilis genetikai elemhez kapcsolódó *aph(3')-IIa*-t találtunk *B. subtilis*ben, amely összhangban van az *E. coliban* talált hasonló eredményekkel (Jia és mtsai. 2017). Míg az *aadA2*-t és a *sul1*-t plazmidokon írták le *E. hormaechei*-ben (Umeda és mtsai. 2020), addig mi iMGE-khez társultan találtuk őket. Az iMGE-hez kapcsolt *poxtA*-ra vonatkozó eredményünk az *E. faecium*ban összhangban van a jelenlegi irodalommal (Lei és mtsai. 2021). Ugyanígy a *poxtA* és egy iMGE együttes előfordulását találtuk *L. paracasei*ben. Ezt a jelenséget ebben a fajban a legjobb tudomásunk szerint még nem publikálták.

Az *erm(44)v* és az *IsaE* gén profágokkal társult *S. pseudoxylosus* és *S. suis* baktériumokban. Míg a szakirodalomban ismert hasonló összefüggés az *erm(44)v* (Wendlandt és mtsai. 2015) kapcsán, az *IsaE* génről nem állnak rendelkezésre mobilitási jellemzőkkel kapcsolatos részletek (Nicholson és mtsai. 2021).

Az összes többi mobil ARG-t olyan kontigokon detektáltuk, amelyeket plazmidokból származóknak prediktáltunk.

Szakirodalmi adatok alapján már korábban plazmidhoz kapcsoltan detektált gének az egyes baktériumok esetében az alábbiak voltak: az *aadA2* *A. baumannii*ban (Jia és mtsai. 2017); az *aadA2* és *sul1* *E. hormaechei*ben (Jia és mtsai. 2017); az *aph(3')-IIIa* *E. faecalis*ban (Jia és mtsai. 2017); a *sul2* *E. coliban* (Jia és mtsai. 2017); az *aph(3')-IIIa* *L. plantarum*ban (Zakaria és mtsai. 2021); a *qnrD1* *P. rettgeri*ben (Jia és mtsai. 2017); az *ant(6)-Ia* *S. aureus*ban (Jia és mtsai. 2017) és az *erm(44)v* *S. saprophyticus*ban (Wendlandt és mtsai. 2015).

Tudomásunk szerint még nem publikálták a következő gének plazmidhoz kötött előfordulásáról az alábbi baktériumokban: az *aph(3')-IIa* gén *B. subtilis*ban; *dfrG* *Gracilibacillus* sp. SCU50-ben; *ant(9)-Ia* *L. acidiphiscis*ben; *IsaE* *S. suis*ban; *qnrS1* *Cronobacter* sp. JZ38-ban, *erm(44)v* *S. carnosus*ban és *S. pseudoxylosus*ban.

Hao és mtsai. (2019) leírták a *poxtA*-t *E. faecalis*ban, egy mobil elemeket tartalmazó multirezisztencia-plazmidba ágyazódottan. Ezt a gént számos Gram-pozitív baktériumban találták meg,

beleértve az *Enterococcus* fajokat is, de sem *L. plantarum*-ban, sem *L. brevis*-ben nem azonosították. Korábbi eredmények megerősítik a *vat(E)* előfordulását plazmidokon (Soltani és mtsai. 2000). Mindazonáltal, annak ellenére, hogy gyakran jelen van *Enterococcus* fajokban (Cho és mtsai. 2020), nincs korábbi bizonyíték a plazmidhoz kapcsolható megjelenésére *L. plantarum*-ban. Az, hogy megtaláltuk az *aph(3')-IIIa* gént *T. halophilus*-ban egy plazmidon, ami összhangban van azzal a ténnyel, hogy az *aph(3')-IIIa*-t gyakran azonosítják magas molekulatömegű plazmidokon és kromozómákon *Enterococcus* fajokban (Jaimee, Halami, 2017). Ennek ellenére legjobb tudásunk szerint az *aph(3')-IIIa* gén leírása *T. halophilus*-ban úttörő eredménynek számít.

7.1.4. Az ARG-mobilitás jelentősége

Az ARG-k mobilitási jellemzői nem csak a mintákkal összefüggésbe hozható közegészségügyi kockázatokról nyújthatnak információt, hanem a gének lehetséges eredetére is utalhatnak. Az emberi beavatkozástól függetlenül az ARG-k jelen vannak mikrobiális közösségekben (Martínez, 2008). Az antimikrobiális szerek helyes és helytelen használata azonban fokozza az ARG-k horizontális átvitelét, és így hozzájárul az AMR terjedéséhez. Mivel állattenyésztési ágazatban gyakori az antibiotikumok használata, az ürülékükben és az állatok környezetében (H. Wang és mtsai. 2023) megjelenő baktréiumok sokszor ARG-kben gazdagnak mondhatók. Gazdaság levegőjében (Bai és mtsai. 2022), eszközökön, járműveken, legelőkön, termőföldeken vagy az állatokat körülvevő az állatokkal kapcsolatos egyéb helyeken (Pitta és mtsai. 2020) is mutattak már ki ARG-tartalmú mikroorganizmust. A szilázs a gazdaságokban közvetlen fizikai kapcsolatba kerülhet ezekkel a baktériumokkal, és így feltételezhető, hogy néhány ARG-vel szennyeződhet. Ebből adódóan az ARG-k jelenléte a szilázmintákban várható volt, de a rezisztenciagének és iMGE-k gyakorisága tovább növekedhet az antibiotikumok használata miatt.

A kimutatott ARG-kkel kapcsolatosan az antimikrobiális szerek használatának felülbírálata, valamint a lehetséges klinikai jelentőségüknek további vizsgálata mellett, a fenotípusos megnyilvánulások és a közegészségügyi megfontolások szintén fontosak. Az intenzív antimikrobiális szerhasználat (AMU) összefüggésbe hozható az AMR előretörésével, mivel az antibiotikumnyomás szelektálja a túlélést elősegítő ARG-t hordozó baktériumokat. Mennyiségileg az AMU jelentős része világszerte a mezőgazdaságból származik (Landers és mtsai. 2012; Van Boeckel és mtsai. 2019).

Az intenzív mezőgazdaság, amely az állati fehérjék iránti globális kereslet kielégítését szolgálja, antibiotikumokra támaszkodik a betegségek kezelésében és megelőzésében, valamint esetenként a takarmány hasznosulás növelésekor is. A gazdasági haszon maximalizálása érdekében néhány ország még mindig engedélyezi az alacsony dózisú antibiotikumok növekedést elősegítő alkalmazását (Founou és mtsai. 2016), míg más régiók, mint például az Amerikai Egyesült Államok vagy az Európai Unió, betiltották ezt a gyakorlatot. Mindazonáltal a fertőző betegségek tüneti kezelése mellett még mindig széles körben használják az antibiotikumokat metafilaktikus és profilaktikus célokra nagyobb dózisban az állattenyésztésben (Baptiste, Kyvsgaard, 2017; Word és mtsai. 2020).

Annak ellenére, hogy a baromfi- és sertésenyésztési ágazathoz képest az átlagos antibiotikum-felhasználás a szarvasmarha-tartók körében alacsonyabb (Van Boeckel és mtsai. 2015), így is gyakran választanak antimikrobiális szereket e faj esetében. A szarvasmarhatartásban a felnőtt egyedeknél a tőgygyulladás az antibiotikumok beadásának legfőbb oka, míg a borjak esetében bélgyulladás és tüdőgyulladás miatti alkalmazás dominál (Krömker, Leimbach, 2017; Sawant és mtsai. 2005).

Különböző jelentések és tanulmányok szerint (EMA, 2020; FDA, 2020; Sawant és mtsai. 2005) a tetraciklinek megkerülhetetlen jelentőségűek a szarvasmarhák gyógyszeres kezelésében világszerte, valamint a béta-laktámok, makrolidok, szulfonamidok, lincosamidok és ionofór antibiotikumok szintén igen széles körben használatosak. Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) osztályozása szerint a legmagasabb prioritású, kritikusan fontos antibiotikumok csoportjába tartozó (HPCIA), harmadik és negyedik generációs cefalosoprinok, fluorokinolonok és polimixinek használata még mindig elterjedt gyakorlat a haszonállattartásban, bár eladási arányuk (EMA, 2020) elmarad a leggyakrabban alkalmazott antibiotikum-csoportoktól (EMA, 2020).

Az általunk vizsgált mintákban *E. faecium*ban, *L. paracasei*ben, *L. plantarum*ban, *L. brevis*ben, *S. aureus*ban és *S. suis*ban mutattunk ki olyan géneket, nevezetesen *poxtA* és *IsaE*, amelyek több antibiotikum-csoporttal szemben is rezisztenciát biztosíthatnak, beleértve a tetraciklineket is. Ezenkívül a *poxtA*-t iMGE-k közelében találtuk meg *L. paracasei* és *E. faecium* esetében, továbbá *L. brevis*ben plazmidon kódolódott. Eredményeinkkel összhangban szarvasmarhatartáshoz köthető *Enterococcus* fajokat más szerzők is összefüggésbe hoztak tetraciklin-rezisztenciával (Zaheer és mtsai. 2020). Egyes fajoknál a *poxtA* és az *IsaE* gének több, mint egy MGE típussal együtt fordulnak elő. A *L. plantarum* genomjában a *poxtA*-t egy plazmidon és egy iMGE-vel társulva, míg a *S. suis*hoz társuló *IsaE*-t egy fág-hoz csatolt plazmidon prediktálták. Ezek a genetikai jellemzők hozzájárulhatnak az ARG-k baktériumok közötti horizontális átviteléhez, ami kiemelkedő klinikai jelentőséggel bír egy olyan, a szarvasmarha-gyógyászatban (a múltban) gyakran alkalmazott antibiotikum-csoport esetében, mint a tetraciklinek.

E. hormaechei, *E. faecium*, *E. coli*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. brevis*, *S. carnosus*, *S. pseudoxylosum*, *S. saprophyticum* és *S. suis* genomjában más klinikailag jelentős antibiotikum-csoportokkal, például makrolidokkal és szulfonamidokkal szembeni rezisztenciát biztosító gének tökéletes egyezését is azonosítottuk. E gének közül az *IsaE*, *sul1*, *sul2* és *poxtA* esetében még fokozott mobilitás is feltételezhető, mivel több MGE-csoporthoz is társultak.

Az egyetlen tökéletes egyezést a HPCIA-k elleni ARG-k közül, a *qnrS1*-et, amely megerősítheti a fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciát, egy *Cronobacter* fajban mutattuk ki.

A tejelő tehének takarmányában lévő több, feltehetően iMGE-khez kapcsolódó ARG jelenléte potenciálisan hatással lehet az állatok mikrobiótájára. Mivel a *B. subtilis* és az *E. faecium* gyakran részét képezi a szarvasmarháknak szánt probiotikumoknak (Kowalski és mtsai. 2009; Mamuad és mtsai. 2019). Ezek a mikroorganizmusok képesek lehetnek kolonizálni az előgyomrokat (elsősorban a bendőt), így növelve a mikrobiom ARG-készletét. Azonban még ha nem is tudnak szaporodni a bendő által biztosított környezetben, az ARG-k HGT révén mégis elterjedhetnek, különösen antibiotikum-terápia jelenlétében. Továbbá az ARG-k esetleg tovább terjedhetnek az alsó gasztrointesztinális (GI) régiókba. A gyomorba beadott székletmikrobiótátranszfer képes volt helyreállítani a vastagbél mikrobiális populációját humán betegeknél (Cammarota és mtsai. 2014), ami arra utal, hogy normálisan nagy mennyiségű életképes baktéri-

um jut a disztális GI szakaszokba. Hasonló eredményeket találtak szarvasmarháknál, amikor bendőmikrobióta-transzplantációval befolyásolták a hátsó GI szakaszok mikrobapopulációját (Ji és mtsai. 2018).

Ha az ARG-k az egész GI-traktusban elterjednek, komoly állat- és közegészségügyi aggodalmak merülhetnek fel. Az enterális, fertőző betegségek közül a szalmonellózis a tejelő tehenek antibiotikum-terápiájának fő indikációja. E baktériumok fokozott antibiotikum-rezisztenciája hozzájárulhat a betegségből eredő gazdasági veszteségekhez, mivel számos törzs már most is sok antibiotikummal szemben mutat rezisztenciát (Smith, 2015). Továbbá kóros állapotok, például a bendő acidózis során a baktériumok a gazdaszervezet távoli pontjaira juthatnak. Érdekes módon bizonyos mikroorganizmusok esetében a baktériumok transzlokációját még GI-betegség hiányában is leírták emberek és rágcsálók esetében (Rodriguez és mtsai. 2001; Yelin és mtsai. 2019).

A kolonizációs és esetleges ARG-proliferációs folyamatok következményeként a fenotípusosan rezisztens baktériumok által okozott kórképek állatjóléti és gazdasági problémákat okozhatnak. A bélrendszerükben ARG-ket hordozó állatok bélsáron keresztül ARG-kkel szennyezhetik a környezetüket, valamint az állatokkal közvetlenül érintkező mezőgazdasági dolgozókat, sőt a tejtermékek fogyasztói is érintettek lehetnek, mivel a haszonállatok által hordozott, potenciálisan mobil ARG-ket hordozó baktériumok (Perez és mtsai. 2007; Rodríguez, 2014; Young és mtsai. 2015) az emberi fogyasztásra szánt termékekkel is elterjedhetnek. Korábban például emberi fogyasztásra szánt nyers tejmintákban is találtunk ARG-ket (Tóth és mtsai. 2020a).

A fejés során történő bélsárszennyeződés (Oliver és mtsai. 2005) az ARG-k nyers tejbe történő átvitelének egyik lehetséges módja, azonban más útvonalak is lehetségesek. Embereknél és rágcsálóknál például az anyai mononukleáris sejtek a laktáció során mikroorganizmusokat juttatnak a tejbe (Perez és mtsai. 2007; Rodríguez, 2014). Ennek a jelenségnek a lehetőségét szarvasmarhák esetében is leírták (Young és mtsai. 2015). Az ilyen útvonalakon az emberi szervezetbe átjutó ARG-k csökkenthetik az antibiotikum-terápia hatékonyságát. Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a szilázs pontos szerepébe az ARG lehetséges átviteli folyamataiban, még számos pontot kell megvizsgálni és tisztázni. Elengedhetetlen lenne elemezni az állatok szervezetébe kerülő, szilázs által hordozott ARG-t tartalmazó baktériumok kolonizációs sikerét, valamint az invazív donor baktériumok ARG-transzferének mértékét a gyomor-bélrendszerben élő recipiens baktériumokra.

A vizsgálatba bevont szilázs *Medicago* eredetű, és eredményeink csak két projekt adatain alapulnak. Ezért szükséges lenne más lucerna és kukorica szilázsok ARG-tartalmának vizsgálata is. Az antimikrobiális rezisztencia globális fenyegetést jelent a közegészségügyre, amely a mezőgazdaságot és az egészségügyi ágazatot egyaránt érinti. Az antibiotikumok állatorvosi használata meghaladja az emberi alkalmazás mértékét (J. Liu és mtsai. 2019). Az antibiotikumhasználat a haszonállat-gyógyászatban szintén kockázatnak számít, mivel az antibiotikummaradékok (Chen és mtsai. 2019) az ARG-k közvetett átviteli útvonalát biztosíthatják az élelmiszerláncon keresztül (Pokharel és mtsai. 2020). Annak ellenére, hogy az állatgyógyászati célból alkalmazott antimikrobiális szerek nemkívánatos hatást gyakorolhatnak az élelmiszerláncra, az ARG-k jelenléte a tejelő szarvasmarhák takarmányozásával kapcsolatos kutatásokban még mindig alulreprezentált a szakirodalomban.

Eredményeink szerint az erjesztett takarmányokban található mikrobátömegnek más egészségügyi kockázatai is vannak, mint a fertőző betegségek, például a lisztériózis átvitele (Raschle és mtsai. 2021). Ezen takarmányok baktériumtartalma, amely vagy az erjesztési folyamatokhoz szükséges, vagy a gazdaságokban különböző szennyeződésekől származó baktérium, lényeges szerepet játszhat az ARG-k élelmiszerláncban keresztül történő átvitelében.

7.2. Tejlő tehének kondíciópontozása neurális hálózatokkal

A szarvasmarhák kondíciójának neurális hálózatokkal történő becslésére több lehetséges megközelítés létezik (Alvarez és mtsai. 2018; Çevik, 2020; Yukun és mtsai. 2019). A szakirodalomban elterjedtebb megközelítés az, hogy a neurális hálózat betanításához nagy felbontású, például 0,25 vagy 0,5 léptékű skálán pontozott állatok felvételeit használják, és tesztelik, hogy a betanított hálózat hogyan teljesít a predikció megbízhatósága alapján ugyanezen a skálán. Ha a megfigyelt és a prediktált pontszámok között semmifajta eltérést nem engedünk meg, akkor ebben az esetben gyenge egyezést kapunk, ahogy azt Yukun és mtsai. (2019) munkájában is láthatjuk (Cohen-féle k κ =0,45). Ha megengedtünk némi eltérést a megfigyelt és a prediktált pontszámok között, mind a Cohen-féle k κ , mind a pontossági értékek javultak. Vizsgálatunk első lépéseként követtük ezt a megközelítést, és más szerzők által bemutatott megbízhatósági értékekhez hasonló eredményeket kaptunk (Alvarez és mtsai. 2018; Anglart, 2014; Bercovich és mtsai. 2013; Krukowski, 2009; Shelley, 2016; Spoliansky és mtsai. 2016; Yukun és mtsai. 2019).

Úgy éreztük azonban, hogy ezeken a nagy felbontású pontszámosztályokon kívül érdemes megvizsgálni, hogy a gyakorlati szempontból fontos BCS kategóriák esetében milyen predikciós minőséget lehet elérni. Ezt a vizsgálatot két formában végeztük el. Az egyikben neurális hálózatot tanítottunk nagy felbontású, részletes, 12-pontos adathalmazon, majd mind a predikciókat, mind az eredeti szakértői pontszámokat három tartományba soroltuk. Így volt egy céltartomány-kategória, valamint a céltartomány alatti és feletti kategóriák minden egyes laktáció szakaszra (T1, T2, T3 és T4). A második megközelítésben a neurális hálózatot a már három kategóriára osztott adatsorral képeztük ki, és három osztálynak megfelelő predikciókat készítettünk. Ez a megközelítés relevánsabb lehet a gazdaságok számára, mert alacsonyabb érzékenységgű, de megbízható predikciókat adhat, ami szűrőeszközként alkalmazható. Azon állatok, melyek kondícióját a modell a céltartományon kívülre prediktálja, tovább vizsgálhatók. A teszt- és validációs halmaz predikciói azt mutatták, hogy az utóbbi megközelítés jobb eredményeket adott, kisebb zaj mellett. A három kategóriára való felosztás után a 12 kategóriára tanított hálózatok is jó eredményeket adtak, de ezek az eredmények zajosabbak voltak, és kevésbé robusztus megközelítésként értékelhetők. Ez érthető, mivel a BCS osztályok ordinálisak, nem pedig folytonosak (X. Song és mtsai. 2019).

Azt is figyelembe vettük, hogy a neurális hálózat milyen valószínűséggel rendelte a BCS-osztályt az egyes képeken észlelt objektumhoz. A bemutatott Cohen-féle k κ és pontosság értékeket ennek az osztályhoz rendelési valószínűségnek a függvényében vizsgáltuk. Látható, hogy a predikciók pontossága javult az osztályba rendelési valószínűség növekedésével. Mindazonáltal az osztályba sorolási valószínűség növekedésével egyre kevesebb képet tudott a modell besorolni. Gyakorlati szempontból ez azt jelenti, hogy ha a modellünket a való életben

használnánk, akkor a pontozni kívánt állatok egy részéről nem kapnánk információt. Ahogy növeljük az osztályba sorolási valószínűség küszöbértékét, ezen állatok arány egyre magasabb lesz. A 12 osztállyal és a 3 osztállyal tanított hálózatok összehasonlításakor látható (6.4. és 6.5. ábra), hogy az előbbiek esetében az osztályba sorolási valószínűségek alacsonyabbak voltak, mint az utóbbiak esetében. Emiatt a predikcióba bevont képek osztályba sorolási valószínűségének növelésével, a 12 osztályon képzett neurális hálózat által megjósolt használható képek száma gyorsan csökkent, míg a 3 osztályon képzett hálózatok esetében a használható képek száma sokkal lassabban csökkent. Még a legmagasabb küszöbértéknél is a képek nagyjából fele maradt meg. Ilyen megközelítéssel nem talákoztunk a szakirodalomban, ahol a predikciós pontosságot az osztályba sorolási valószínűséggel együtt elemezték volna. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy ez jelentősen befolyásolja az előrejelzés minőségét és ezáltal a neurális hálózatokon alapuló BCS-predikció gyakorlati hatékonyságát. A fentiek figyelmebe vételével a három osztályos csoportosítás inkább „könnyebb” feladatnak tekinthető a hálózat számára (6.8. és 6.9. ábra), így a modell magasabb megbízhatósága az osztályok jobb predikciója vonatkozásában indokolt volt.

A 12 és a 3 osztályra képzett hálózatok összehasonlításakor látható, hogy az előbbiek esetében az osztályhoz rendelési valószínűségek alacsonyabbak voltak, mint az utóbbiak esetében. Emiatt, ahogy növeltük az előrejelzési pontosság elemzésébe bevont képek osztályozási valószínűségének küszöbértékét, a 12 osztályon képzett neurális hálózat által megjósolt használható képek száma gyorsan csökkent, míg a 3 osztályon képzett hálózatok esetében a használható képek száma sokkal lassabban csökkent az osztályozási valószínűség küszöbértékének növekedésével. Még a legmagasabb küszöbértéknél is a képek nagyjából fele maradt meg. Ilyen megközelítéssel nem talákoztunk a szakirodalomban, ahol az előrejelzési pontosságot az osztályozási valószínűséggel együtt elemezték. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy ez jelentősen befolyásolja az előrejelzés minőségét és ezáltal a neurális hálózatokon alapuló testállapot-előrejelzés gyakorlati hatékonyságát.

Emiatt, ahogy növeltük a predikciók pontosságának elemzésébe bevont képek besorolási valószínűségének küszöbértékét, a 12 osztályon tanított neurális hálózat által használható képek száma gyorsan csökkent, míg a 3 osztályon tanított hálózatok esetében a besorolási valószínűség küszöbértékének növekedésével a használható képek száma sokkal lassabban csökkent. Még a legmagasabb küszöbértéknél is a képek nagyjából fele maradt meg (6.8. ábra).

Ilyen megközelítéssel nem talákoztunk a szakirodalomban, ahol a predikciós pontosságot az osztályozási valószínűséggel együtt elemezték. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy ez jelentősen befolyásolja a predikció minőségét és ezáltal a neurális hálózatokon alapuló BCS-predikció gyakorlati hatékonyságát. Mindazonáltal továbbra is problémás, hogy a magasabb osztályozási valószínűségű képek száma kevesebb volt, mint a predikcióhoz használt halmazban lévő állatok száma. Az eredmények azt mutatják, hogy a legmegbízhatóbb osztályozási valószínűség küszöbértékénél az állatok felét elvesztettük, ami azt jelenti, hogy egy adott napon az állatok felére vonatkozóan kaptunk megbízható BCS információt.

Célunk azonban az, hogy egy adott állomány összes egyedéről napi információt kapjunk. Több lehetőséget látunk ennek a problémának a megoldására, amit további vizsgálatok tisztázhatnak. Az egyik megközelítés alapja lehet az a tény, hogy az állatokról nem csak egyszer, hanem többször is felvételt készítünk a fejés során a körforgós fejőállású rendszerekben. Az egyes

tehenekről készült minden egyes fénykép alapján prediktálunk egy BCS kategóriát. Az így létrejött predikció-halmaz osztályeloszlásából azonosíthatnánk a legnagyobb valószínűségű osztályt. Mindazonáltal az 6.9. ábrából megállapíthatjuk, hogy a 3 osztályon betanított CNN-ek predikciója jelentős arányban mutatott erős egyezést, ami jobb volt, mint a szakirodalomban talált értékelők közötti egyezés.

A gyakorlatias küszöbértékek használata a 12 osztállyal tanított és 3 osztállyal értékelt megközelítésben problematikus. Több szerző is kimutatta, hogy 0,25 vagy 0,5-es hibatarományokban magas predikciós megbízhatóság érhető el (Alvarez és mtsai. 2018; Anglart, 2014; Bercovich és mtsai. 2013; Krukowski, 2009; Shelley, 2016; Spoliansky és mtsai. 2016; Yukun és mtsai. 2019). Amikor azonban megpróbáltuk ezt hozzárendelni az általunk használt gyakorlati kondíció kategóriákhoz, sok esetben lehetetlen volt eldönteni, hogy egy 0,25 vagy 0,5 hibahatárral rendelkező állatot melyik gyakorlati kondíciótartományba soroljunk.

Fontos hangsúlyozni, hogy tanulmányunk célja annak vizsgálata volt, hogy egy neurális hálózat milyen megbízhatósággal képes reprodukálni a szakértő által pontozott állatok pontszámát és pontkategóriáit. Az is lehetséges, hogy egy szakértő helyett több szakértő pontszámaiból építsük fel a modell által használt *ground truth*-t. Érdeemes azonban figyelembe venni, hogy két független szakértő pontszámai között a szakirodalom alapján gyenge vagy közepes az egyetértés. A Mullins és mtsai. (2019) által közölt eredmények szerint a két szakértő BCS-értékei közötti egyezés Cohen-féle kappája 0,62 és 0,66, míg X. Song és mtsai. (2019) szerint az értékelők közötti egyezés Cohen-féle kappája 0,48, míg azonos értékelő esetében az egyezés kappája 0,52 és 0,72. Így egy ilyen alapon felépített neurális hálózat predikciós pontossága könnyen lehet rosszabb is.

Tanulmányunkban a validációs halmaz mellett egy független helyszínről származó tesztalmanzt is használtunk, hogy felmérhessük a neurális hálózat predikciójának robusztusságát. Arra számítottunk, hogy ha ugyanabból a gazdaságból származó állatok adják a tanító és validációs halmazt, akkor a validációs halmazra vonatkozó predikció jobb lesz, mint egy teljesen független gazdaságra vonatkozó predikció. Meglepő módon a három osztályon betanított hálózatok predikciói alig különböztek a teszt- és a validációs halmazok esetében.

Eredményeink további érdekessége, hogy a háromféle határoló doboz (nagy, közepes és kicsi) alapján készült predikció pontossága szintén nagyon kevésbé különbözött. Azért választottunk három különböző méretű annotációs dobozt, mert úgy gondoltuk, hogy egy nagy doboz több információt tartalmaz, mint amennyit az algoritmus meg tud ragadni. Ezzel szemben úgy tűnik, hogy a közepes méretű doboz tartalmazta a legtöbb használható információt, amely még mindig kevés zajt tartalmazott. A következő a sorban a kis doboz volt, amely valamivel jobb eredményeket adott, mint a nagy doboz. Itt úgy gondolhatunk rá, kevesebb információt és, ugyanakkor kevesebb zajt is tartalmazott. Ezzel szemben a nagy dobozban több zaj volt több információ mellett.

Munkánk során nem alkalmaztunk tapintást a szakértői pontszámok létrehozásához, mert a kizárólag képeken alapuló neurális hálózat tanításakor ez az információ nem áll az algoritmus rendelkezésére, így a szakértő többlet információval rendelkezett volna a pontozáskor a neurális hálózathoz képest.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a Detectron2 segítségével egy egyszerű sportkamerával készített kétdimenziós képekből történő betanítás alapján a predikció minősége nem rosszabb,

mint a háromdimenziós kamerákon alapuló predikciók eredményei vagy a tapintásos érzékeléssel történő pontozás (Shigeta és mtsai. 2018; Yu és mtsai. 2020). A predikció minőségének javítása érdekében megfontolandó lehetőség a különböző betanított hálózatok együttes predikcióinak alkalmazása végső kimenetként.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy gyakorlati szempontból releváns céltartományoknak megfelelő osztályokon végzett CNN-tanítás robusztusabb és pontosabb predikciót ad, mint a nagy felbontású osztályokon végzett tanítás. A 3 osztállyal történő tanításon alapuló predikciókkal hasonló vagy még jobb eredményeket kaptunk, mint a szakértők közötti egyetértés. A különböző annotációs régiókkal történő képzésen alapuló predikciós pontosság nem mutatott érdemi különbségeket.

A CNN számára generált súlyokra vonatkozó eredmények nyilvánosan elérhetők. Ezt mások is használhatják előtanított modellként neurális hálózatok hasonló képeken történő tanításához. Így feltehetően kevesebb kép felhasználásával létrehozható neurális hálózat a BCS-kategóriák predikciójához.

A bemutatott eredmények azt sugallják, hogy hasonló eredmények várhatók a kondíció pontozásban más fajták és hasznosítási típusok esetében is. Ez azonban feltételezi, hogy hasonló CNN-eket kell tanítani az adott fajtákra és hasznosítási típusokra alkalmazott pontozási rendszer által generált adathalmazokon. Így az itt bemutatott algoritmus nem használható egy az egyben más fajtákra és hasznosítási típusokra.

7.3. Tej szomatikus sejtszám növekedésének predikciója neurális hálózat-támogatással

A szubklinikai tőgygyulladás a tejlő tehenészetek legnagyobb gazdasági kártétellel járó, szemmel nem detektálható betegsége. A korai detektálása, kezelése csökkentheti a betegség kártételét, ezért szükséges az SM diagnosztikájának folyamatos fejlesztése. Jelenleg általában a SCC-t használják az SM diagnosztikájában, azonban annak direkt meghatározása nem mindennapos gyakorlat. Munkánk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy ANN segítségével javítható-e az SM diagnosztikája, olyan adatokat felhasználva, melyek elérhetőek átlagos fejőgépek használatával. Az ANN predikcióját a gyakorlatban jól ismert és széleskörűen használt, indirekt SM-diagnosztikai módszerrel, a CMT-vel kombináltuk.

Az SM kimutatásának ANN-el történő javítása nem példa nélküli a szakirodalomban (Bobbo és mtsai. 2021; Ebrahimi és mtsai. 2019; Mammadova, Keskin, 2015). A kutatásokban általában fejés során képződő adatokra (elektromos vezetőképesség, laktóz, tej mennyisége, stb.) alapozott gépi tanulási modelleket, köztük ANN-t használtak SM-detekcióra. A használt modellek predikciós értékei általában kiemelkedőnek bizonyultak a hagyományos statisztikai megközelítésekhez képest. Azonban az általunk bemutatott kombinációs megközelítést nem találtunk a szakirodalomban. Mivel diagnosztikai szempontból a pozitív egyedek megtalálása fontosabb, a PPV növelése a gyakorlati cél, amit a teszt specifitásának növelésével érhetünk el. Ennek megfelelően a neurális hálózat súlyait úgy változtattuk a tanítás során, hogy a specifitás értékét magasan tartva növeltük a szenzitivitást. Általában a modellek klasszifikációs

hatékonyságát a ROC AUC-érték alapján értékelik (Bobbo és mtsai. 2021). Azonban ennek maximalizálása nem jelenti a specificitás maximalizálását is egyben.

Az ANN alapján becsült predikciós értékek a PPV esetén kettő az NPV esetén egy CMT predikciós teljesítménynél jobbnak mutatkozott. Amit úgy is értelmezhetünk, hogy mindkét predikciós érték vonatkozásában a CMT-vel összevethető predikciós teljesítményt nyújt az ANN. Míg a CMT kivitelezése munkaigényes folyamat, addig az olyan fejőházakban, ahol hasonló tej, illetve tejleadási adatok mérhetők automatizáltan, mint, amiket mi használtunk a munkánkban, napi szinten minden egyedre vonatkozóan kaphatunk SCC-növekedési predikciókat. Ez nem jelenti azt, hogy az általunk tanított neurális hálózat, illetve súlyai minden telepen használhatók lennének. De úgy gondoljuk, hogy olyan telepeken, ahol hasonló forrásadatok elérhetők, az általunk kialakított munkafolyamat meglehetősen gyorsan adaptálható.

A diagnosztikai tesztek predikciós értékének javítására az epidemiológiában gyakran használt megoldás a tesztek kombinációja. A tesztek kombinációjából származó eredmények értelmezésében fontos figyelembe venni, hogy annak alapfeltétele, hogy az alkalmazott tesztek függetlenek legyenek egymástól. Az SCC megemelkedését a munkánkban alkalmazott két teszt eltérő alapon detektálja. A CMT a tejbeli megemelkedett sejtszámból adódó nagyobb mennyiségű DNS-t, míg az ANN a tejnek ettől független jellemzőit használja fel. Mivel így a két teszt nem korrelált, a kombinációjukból származó predikciók megalapozottnak tekinthetők. Így a két teszt párhuzamos vagy sorozatkombinációja lehetséges. Előbbi esetén a kombinált teszt szenzitivitása, utóbbinál a specificitása lesz nagyobb, mint a felhasznált egyedi teszteké. Az SM vonatkozásában más szerzők (Gohary, McDougall, 2018) is rámutattak erre. Azonban arra vonatkozóan nem találtunk adatokat, hogy az ANN és CMT kombinációja hogyan változtatja meg a prediktív értékeket. Ők különböző IMI indirekt kimutatására alkalmas vizsgálatok kombinációit értékelve arra jutottak, hogy a CMT vagy a tej elektromos vezetőképességének SCC-vel együtt felhasználva csak mérsékelt javulást eredményez a diagnosztikában ahhoz képest, hogy, ha csak önmagukban értékeljük őket (Gohary, McDougall, 2018). A 6.10. ábra alapján látható, hogy az ANN és CMT kombinációja javítja a prediktív értékeket az egyedi tesztekhez viszonyítva. Ha, ahogy a modelszelekciónál, itt a tesztek kombinációjánál is az a célunk, hogy a PPV-t növeljük, amit a specificitás növelésével érhetünk el, akkor a sorozateszteléssel érhetjük el azt.

Mivel a prediktív értékek becsülésében a pre-test probability az egyik paraméter, az NPV és a PPV függ ennek értékétől. Ezért a becslésekben különböző a szakirodalomban fellelhető prevalencia értékeket használtunk, hogy gyakorlatban elképzelhető helyzetekben mutassuk be a prediktív értéket változásának mértékét. Ugyanez vezérelt minket, amikor a CMT diagnosztikai megbízhatóságára vonatkozó szakirodalmi adatokat gyűjtöttük. Habár törekedtünk arra, hogy a szakirodalomból olyan prevalencia, szenzitivitási és specificitási adatokat gyűjtsünk össze, amelyek dokumentáltan köthetők a 200 000 sejt/mL SCC határértékhez, a felhasznált tanulmányok lefolytatásában, kiértékelésében és az eredményeik bemutatásában vannak heterogenitások.

A bemutatott modell kiegészítését, fejlesztését jelenthetné, ha egyéb automatikusan mérhető állatjólétre és termelésre vonatkozó paramétereket is bevonnánk a predikcióba. Például hőkamerával készített felvételek bizonyítottan alkalmasak a tőgygyulladás korai detekciójára (Silva és mtsai. 2021). Feltételezhető, hogy egy hőkamera által biztosított információval kiegészítve

jobb predikció érhető el a gyakorlatban. Azonban ezek feltárásához további vizsgálatok szükségesek. Ahogy további vizsgálatok szükségesek ahhoz is, hogy a gyakorlatban kipróbálva a megközelítésünket, gold standard módszerekkel hasonlítsuk össze a predikciókat.

7.4. Baktériumtelepek növekedésének becslése mély tanulással

A legjobb eredményt adó modell a képenkénti összes telep detektálását 0,31 másodperc alatt végezte el, függetlenül a telepek számától. Bär és mtsai. (2020) munkájukban a Supplementary Table 3-ban 16 tenyészetre vonatkozóan adtak meg részletes detektálási időket, amelyek alapján a képenkénti átlag 8,8 s (SD: 7,35 s) volt, ami a CNN eredményünknek a 28-szorosa. Az első telepek detekciós idejének mediánja a Ctrl csoportban (9,4 h) 0,4 h-későbbinek adódott, mint amit Bär és mtsai. (2020) mutatott be (9 h). A Rifa csoportban viszont a 17,4 h (Bär és mtsai. 2020) helyett mi 13,2 h-t kaptunk a megjelenési idők mediánjának. Így a két csoportbeli első telepek megjelenési idejének mediánjai közötti 8,4 h (Bär és mtsai. 2020) helyett 3,8 h-t kaptunk.

A tenyésztés első 24 órájára vonatkozó óránkénti telepsugár növekedési értékek a 150 telepnél kevesebbet tartalmazó Ctrl tenyészetekben Bär és mtsai. (2020) becslése szerint $60,4 \mu\text{m}$ volt. Ugyanazzal a statisztikai megközelítéssel számítva a betanított CNN-ünk $60,3 \mu\text{m}$ -t becsült, amely az előzővel összehasonlítva mindössze $0,1 \mu\text{m}$ különbséget (0,2%) jelent. Ugyanakkor úgy gondoljuk, hogy az ismételt mérések miatt korrektebb megközelítést jelent a mixed-effect modell alkalmazása, mivel longitudinális adatelemzésre a klasszikus lineáris modell kevésbé alkalmas. Ezzel szemben a mixed-effect modell olyan statisztikai eljárás, amely rugalmasan kezeli a korrelált longitudinális adatokat (Pusponero és mtsai. 2017). Ezzel a módszerrel ugyanerre a halmazra $58,7 \mu\text{m}$ -t kaptunk, ami a referenciától $1,7 \mu\text{m}$ -es eltérést (2,8%) jelent. A szomszédosságot nem figyelembe vevő becsléseknél azt láthatjuk, hogy a 150 telepszámnál kisebb tenyészetekben mindig nagyobb a sebesség, mint az összes tenyészet együtteséből számított érték. Ez a Ctrl csoportnál jelentősebb ($7,7 \mu\text{m}/\text{h}$), a Rifa csoportban kisebb ($2,6 \mu\text{m}/\text{h}$). A Ctrl csoportban mindkét megközelítésben azt látjuk, hogy a növekedési sebesség csökken a szomszédok számának növekedésével, egészen a 3 szomszéddal rendelkező alcsoportig. A 4 szomszéddal rendelkezők viszont megemelkedett növekedési sebességet mutatnak. A 6.2. táblázat alapján a 4 szomszéddal rendelkező telepek száma igen alacsony, így az ezekre vonatkozó becslések kevésbé megbízhatók. Az összes Rifa tenyészetet felhasználó elemzésekben azt látjuk, hogy a szomszéddal nem rendelkezők kisebb sebességgel növekszenek, mint a szomszéddal rendelkezők, amelyek között pedig a szomszédok számának növekedése egyértelmű sebességcsökkenést jelez. A 150 telepnél kevesebből álló Rifa tenyészetekben ilyen szabályszerűség nem látható.

A telepek növekedési görbéit bemutató 6.14. ábrát összehasonlítva Bär és mtsai. (2020) Supplementary Figure 10-ével azt láthatjuk, hogy a követett telepek utolsó méretei a mi becsléseinkben többször meghaladják ugyanazokon a tenyészeteken Bär és mtsai. (2020) által bemutatott értékeket.

Szemmel átnézve az eltérő tenyészeteket, azt látjuk, hogy míg a kisebb telepeken a prediktált határoló dobozok szűkebbek, jobban megközelítik a telepek határát, addig a nagy telepeknél jelentősen eltérhetnek attól. Ha a korábban említett első 24 órán belüli növekedési sebességek

minimálisnak tekinthető eltérését ennek tükrében átgondoljuk, akkor ez magyarázható azzal, hogy annak a periódusnak a végéig még elég kicsik a telepek, és a predikciókat nem torzítja a telepsugár mérete. Úgy gondoljuk, hogy a nagy telepek pontatlanabb határoló doboz becslésének az oka lehet az, hogy a tanítóhalmazban használt képek olyan tenyészetekről készültek, amelyek 24-48 óráig voltak inkubálva. Ennek következtében kevés fajnál alakulhattak ki olyan nagy telepek mint a Bär és mtsai. (2020) 68 órás tenyészeteiben. Ezt a pontatlanságot olyan tanítóhalmaz felhasználásával lehetne csökkenteni, amely tartalmaz hosszabban inkubált tenyészeteket is.

Úgy gondoljuk, hogy az eredményeink alapján a CNN-alapú baktériumtelep detekció, illetve az arra épülő baktériumtelep növekedési dinamikai elemzések hatékony eszközévé válhatnak a bakteriológiai munkáknak, kutatásoknak.

7.5. Kitekintés: a gépi tanulás jelene és jövője

A mezőgazdasági technológiák és a precíziós gazdálkodás új tudományággá nőttek ki magukat, amelyek lényege, hogy adatintenzív megközelítést alkalmaz a termelésben, miközben minimalizálja a környezeti terhelést. Jelenleg azonban még általános probléma, hogy a keletkező nagy mennyiségű adat vagy egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben alakul át szakmailag értelmezhető információvá.

A nagylétszámú telepeken képződő hagyományos vagy PLF alapú adatok értelmezéséhez használt klasszikus statisztikai eszközökön túl egyre inkább terjedőben vannak a gépi tanulási algoritmusok (Benos és mtsai. 2021). Ezek segítségével a gazdálkodó könnyebben és gyorsabban tud döntést hozni adott szituációban (Liakos és mtsai. 2018). Ez különösen fontos tulajdonság, ha figyelembe vesszük, hogy az állati termékek iránt világszerte növekszik a kereslet (Berckmans, 2014; Liakos és mtsai. 2018; Tullo és mtsai. 2019), miközben az agráriumban dolgozók aránya folyamatosan csökken. Ezzel szemben az automatizáció fokozásával kifejezetten nagy méretű állatállományokat is kezelhetővé tehetünk (Wathes és mtsai. 2008). Több szerző is az automatizációban, azon belül is a gépi tanulás széles körű elterjedésében látja az állattartás gazdaságos és fenntartható jövőjét (Benos és mtsai. 2021; Liakos és mtsai. 2018; Wathes és mtsai. 2008). Az ML önmagában is számtalan fennálló problémára nyújtott megoldást a közelmúltban, de más módszerekkel kombinálva tovább növelhető a hatékonyságuk. Például Yamakawa és mtsai. (2020) munkájukban epilepsziás rohamok előrejelzésére alkalmas gépi tanulási modell pozitív prediktív értékét javították statisztikai folyamatszabályozás segítségével.

A statisztikai folyamatszabályozás az iparból kiinduló, de mára már a mezőgazdaságban is elterjedt módszer, mely segítségével az állattermék-előállítás folyamata hatékonyabbá tehető. A módszer lényege, hogy a termelési mutatók ellenőrző diagramokkal történő monitorozásával időben kiszűrhetők az anomáliák, így csökkentve a termelés kiesés mértékét (Nagy és mtsai. 2017).

Míg az iparban számtalan publikáció létezik a gépi tanulás és a statisztikai folyamatszabályozás kombinálására (Apsemidis és mtsai. 2020), addig a biológiai témájú kutatásokban, mint például egészségügyi-, mezőgazdasági szektor vizsgálatai, ezek alulreprezentáltak. Yamaka-

wa és mtsai. (2020) eredményei is azt támasztják alá, hogy a jövőben érdemes lehet a biológiai folyamatok vizsgálatában is alkalmazni ehhez hasonló hibrid megoldásokat.

Annak ellenére, hogy az ML modellek képesek az adatokban rejlő minták azonosításán keresztül bonyolult feladatokra megoldást adni (Boutaba és mtsai. 2018), számos hátlütőjük említhető.

Ilyen az adatérzékenységük, ami a hatékonyságuk kritikus pontja. Amikor a való életből származó adatokkal dolgozunk a legritkább esetben találkozunk jól dokumentált, jól strukturált, kellő gyakorisággal és pontossággal, különböző forrásokból gyűjtött, sokféle és nagy mennyiségű adattal. Sokkal inkább a retrospektív adatgyűjtés a jellemző, aminek sokszor velejárói a kétértelmű-, hiányzó-, kiugró értékeket és értelmetlen adatokat tartalmazó adatsorok (Sarker, 2021). Ezeket sok esetben rosszul kezelik az ML modellek, ami a hatékonyság romlásában mutatkozik meg.

A másik hatékonyságot negatívan befolyásoló körülmény az adott feladatra alkalmatlan modell választása. Azon túl, hogy figyelembe vesszük modellválasztásnál a modell alapvető tulajdonságait (pl.: felügyelt vagy felügyelet nélküli tanulásra alkalmas, tabuláris adatokon vagy képeken teljesít-e jobban, stb.), az a szokás, hogy több eltérő modellt próbálunk ki párhuzamosan, és a legkisebb hibát eredményező(ke)t tartjuk meg.

Az ML általánosságban vett nehézségein túl, a mezőgazdaságban való alkalmazását számos egyéb, az agráriumra jellemző tényező is terheli. A gyakorlatban való felhasználást nehezíti az a körülmény, hogy az ML rendszerek adatérzékenysége miatt a megfelelő adatgyűjtés általában nagyszámú érzékelőn keresztül valósul meg. Ezek sokszor drágák, kezdetben jelentős befektetést igényelnek az állattartó, növénytermesztő részéről (Yang és mtsai. 2021), melyek gátat jelenthetnek a beszerzésüknek. Továbbá a termelés felügyeletére megvásárolt különböző gyártmányú érzékelők sokszor nem alkalmasak arra, hogy egy szabványosított adatszerkezetet biztosítsanak az egyes gyártók különböző módszerei miatt (Cockburn, 2020).

Egy adott adathalmazon, környezetben betanított ML kiterjeszhetősége változó. Ami azt jelenti, hogy egy adott állományban fejlesztett és jól prediktáló modell nem biztos, hogy máshol is ugyanolyan jól működik. Azonban érdemes rámutatni az előtanított modellek kínálta lehetőségekre. A transfer learning módszerével lehetőségünk nyílik az olyan nagy adat és számításigényű modellek, mint a neurális hálózatok, tanításának megkönnyítésére. Egy betanított ANN neuronjaihoz tartozó súlyokat egy másik ANN-nek, azonos feladatra való tanítása során kezdeti paraméterként lehet használni. Így az új adatokon történő tanítás egy előtanított ANN-ből indul ki. Ez azzal jár, hogy az ilyen módon végzett adaptálás kevesebb új tanító adatot igényel. Ezt felismerve nem kivételes az, hogy a területen dolgozó kutatók az általuk létrehozott súlyokat közzéteszik, ezáltal mások fejlesztéseit megkönnyítve (Nagy és mtsai. 2023c).

A korlátait figyelembe véve a gépi tanulás és azon belül a mesterséges neurális hálók a mezőgazdaságban hatékony eszközt adnak a kezünkbe, hogy optimalizálhassuk a termelési hatékonyságot, és ezzel párhuzamosan csökkenthessük a termelés okozta környezeti terhelést (Benos és mtsai. 2021; Liakos és mtsai. 2018).

8. Új tudományos eredmények

8.1. Antimikrobiális rezisztencia gének és mobilitásuk szilázs mintákban

A talált ARG-k közül feltételezhetően 53 mobilis, melyből 10 iMGE-hez, 41 plazmidhoz és kettő profágához köthető.

8.2. Tejelő tehének kondíciópontozása neurális hálózatokkal

Az ANN predikciója a Cohen-féle kappa és a pontosság tekintetében a humán pontozókéhez hasonló szintet ér el. A 3 osztályon betanított neurális háló predikciója jelentős arányban mutatott erős egyezést, ami jobb volt, mint a szakirodalomban talált humán értékelők közötti egyezés.

8.3. Tej szomatikus sejtszám növekedésének predikciója neurális hálózat-támogatással

ANN segítségével az SCC-emelkedést 0,54-es specificitással és 0,77-es szenzitivitással tudtuk kimutatni. Ha az általunk létrehozott ANN-t CMT-vel sorozatosan kombináljuk 20%-os prevalenciánál 55%-os, 30%-os prevalenciánál 39%-os PPV emelkedést érhetünk el az individuális CMT-hez képest.

8.4. Baktériumtelepek növekedésének becslése mély tanulással

A referenciaközleményben leírt statisztikai megközelítéssel számítva, a CNN-ünk a növekedési sebességet 0,2%-os hibával reprodukálta.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Solymosi Norbertnek és Gábor Györgynek a sok segítségért, kitüntető bizalmáért, amelyek hozzájárultak a doktori munkám létrejöttéhez, és tanulmányom ideje alatt kapott tanácsokért, folyamatos figyelmességért.

Köszönet illeti az Eötvös Loránd Tudományegyetem Komplex Rendszerek Fizikája Tanszék kutatóinak, Csabai Istvánnak, Pataki Bálintnak, Udvarnoki Zoltánnak és Biricz Andrásnak, hogy segítettek kiigazodni a mesterséges intelligencia rejtelmes világában.

Külön szeretném megköszönni az Állatorvostudományi Egyetem Bioinformatikai Központ munkatársainak Tóth Adrienn Grétának és Papp Mártonnak, akik szintén nagyban hozzájárultak a munkám elkészültéhez meglátásaikkal, támogatásukkal és ötletadó gondolataikkal.

Szeretnék köszönetet mondani a szarvasmarha telepeken dolgozó kollégáimnak, különös tekintettel Varga Tamásra, akik mindig segítettek a feladatok más megvilágításba helyezésével.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak, különösképpen férjemnek a türelméért, a támogatásért, hogy lehetővé tették doktori munkám elvégzését.

Irodalomjegyzék

- Abadi M., Agarwal A., Barham P., Brevdo E., Chen Z., Citro C., Corrado G. S., Davis A., Dean J., Devin M., Ghemawat S., Goodfellow I., Harp A., Irving G., Isard M., Yangqing J., Jozefowicz R., Kaiser L., Kudlur M., Levenberg J., Mané D., Monga R., Moore S., Murray D., Olah C., Schuster M., Shlens J., Steiner B., Sutskever I., Talwar K., Tucker P., Vanhoucke V., Vasudevan V., Viégas F., Vinyals O., Warden P., Wattenberg M., Wicke M., Yu Y., Zheng X. (2015): **TensorFlow: Large-Scale Machine Learning on Heterogeneous Systems**. Software available from <https://www.tensorflow.org>.
- Albornoz R. I., Giri K., Hannah M. C., Wales W. J. (2022): **An Improved Approach to Automated Measurement of Body Condition Score in Dairy Cows Using a Three-Dimensional Camera System**. *Animals*, 12. 72.
- Alvarez J. R., Arroqui M., Mangudo P., Toloza J., Jatip D., Rodríguez J. M., Teyseyre A., Sanz C., Zunino A., Machado C. és mtsai. (2018): **Body condition estimation on cows from depth images using Convolutional Neural Networks**. *Comput. Electron. Agric.*, 155. 12–22.
- Anderson J., Eftekhar F., Aird M., Hammond J. (1979): **Role of bacterial growth rates in the epidemiology and pathogenesis of urinary infections in women**. *J. Clin. Microbiol.*, 10. 766–771.
- Andersson D. I., Hughes D. (2010): **Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?** *Nature Reviews Microbiology*, 8. 260–271.
- Anglart D. (2014): **Automatic estimation of body weight and body condition score in dairy cows using 3D imaging technique**. SLU, Dept. of Animal Nutrition és Management.
- Apsemidis A., Psarakis S., Moguerza J. M. (2020): **A review of machine learning kernel methods in statistical process monitoring**. *Computers & Industrial Engineering*, 142. 106376.
- Aytan-Aktug D., Clausen P. T., Szarvas J., Munk P., Otani S., Nguyen M., Davis J. J., Lund O., Aarestrup F. M. (2022): **PlasmidHostFinder: prediction of plasmid hosts using random forest**. *MSystems*, 7. e01180–21.
- Badillo S., Banfai B., Birzele F., Davydov I. I., Hutchinson L., Kam-Thong T., Siebourg-Polster J., Steiert B., Zhang J. D. (2020): **An introduction to machine learning**. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 107. 871–885.
- Bahlo C., Dahlhaus P., Thompson H., Trotter M. (2019): **The role of interoperable data standards in precision livestock farming in extensive livestock systems: A review**. *Comput. Electron. Agric.*, 156. 459–466.
- Bai H., He L.-Y., Wu D.-L., Gao F.-Z., Zhang M., Zou H.-Y., Yao M.-S., Ying G.-G. (2022): **Spread of airborne antibiotic resistance from animal farms to the environment: dispersal pattern and exposure risk**. *Environment International*, 158. 106927.

- Balmages I., Liepins J., Auzins E. T., Bliznuks D., Baranovics E., Lihacova I., Lihachev A. (2023): **Use of the speckle imaging sub-pixel correlation analysis in revealing a mechanism of microbial colony growth.** *Sci. Rep.*, 13. 2613.
- Baptiste K. E., Kyvsgaard N. C. (2017): **Do antimicrobial mass medications work? A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials investigating antimicrobial prophylaxis or metaphylaxis against naturally occurring bovine respiratory disease.** *Pathog. Dis.*, 75.
- Bär J., Boumasmoud M., Kouyos R. D., Zinkernagel A. S., Vulin C. (2020): **Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application.** *Sci. Rep.*, 10. 16084.
- Barr D. A., Kamdolozi M., Nishihara Y., Ndhlovu V., Khonga M., Davies G. R., Sloan D. J. (2016): **Serial image analysis of Mycobacterium tuberculosis colony growth reveals a persistent subpopulation in sputum during treatment of pulmonary TB.** *Tuberculosis*, 98. 110–115.
- Benos L., Tagarakis A. C., Dolias G., Berruto R., Kateris D., Bochtis D. (2021): **Machine learning in agriculture: A comprehensive updated review.** *Sensors*, 21. 3758.
- Berckmans D. (2014): **Precision livestock farming technologies for welfare management in intensive livestock systems.** *Rev. Sci. Tech*, 33. 189–196.
- Bercovich A., Edan Y., Alchanatis V., Moallem U., Parmet Y., Honig H., Maltz E., Antler A., Halachmi I. (2013): **Development of an automatic cow body condition scoring using body shape signature and Fourier descriptors.** *J. Dairy Sci.*, 96. 8047–8059.
- Bewley J., Schutz M. (2008): **An interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle.** *Prof. Anim. Sci.*, 24. 507–529.
- Bi Q., Goodman K. E., Kaminsky J., Lessler J. (2019): **What is machine learning? A primer for the epidemiologist.** *Am. J. Epidemiol.*, 188. 2222–2239.
- Bischoff K. M., Skinner-Nemec K. A., Leathers T. D. (2007): **Antimicrobial susceptibility of Lactobacillus species isolated from commercial ethanol plants.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34. 739–744.
- Björkroth K. J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W. H., Korkeala H. J., Vandamme P. (2002): **Taxonomic study of Weissella confusa and description of Weissella cibaria sp. nov., detected in food and clinical samples.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52. 141–148.
- Bobbo T., Biffani S., Taccioli C., Penasa M., Cassandro M. (2021): **Comparison of machine learning methods to predict udder health status based on somatic cell counts in dairy cows.** *Sci. Rep.*, 11. 1–10.
- Bochner B. R. (2008): **Global phenotypic characterization of bacteria.** *FEMS microbiology reviews*, 33. 191–205.
- Bolker B., Robinson D. (2022): **broom.mixed: Tidying Methods for Mixed Models.** R package version 0.2.9.4.

- Bourchoukarn A., Paddock C., Macaluso K., Bourchoukarn W. (2022): **Association between growth rate and pathogenicity of spotted fever group *Rickettsia***. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 16. 374–383.
- Boutaba R., Salahuddin M. A., Limam N., Ayoubi S., Shahriar N., Estrada-Solano F., Caicedo O. M. (2018): **A comprehensive survey on machine learning for networking: evolution, applications and research opportunities**. *J. Internet Serv. Appl.*, 9. 1–99.
- Brockhurst M. A., Harrison E. (2022): **Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox**. *Trends Microbiol.*, 30. 534–543.
- Buchfink B., Xie C., Huson D. H. (2015): **Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND**. *Nat. Methods.*, 12. 59–60.
- Busanello M., Rossi R. S., Cassoli L. D., Pantoja J. C., Machado P. F. (2017): **Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds**. *J. Dairy Sci.*, 100. 6545–6553.
- Cabezón E., Ripoll-Rozada J., Peña A., De La Cruz F., Arechaga I. (2015): **Towards an integrated model of bacterial conjugation**. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39. 81–95.
- Cammarota G., Ianiro G., Gasbarrini A. (2014): **Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review**. *J. Clin. Gastroenterol.*, 48. 693–702.
- Carracedo-Reboredo P., Liñares-Blanco J., Rodríguez-Fernández N., Cedrón F., Novoa F. J., Carballal A., Maojo V., Pazos A., Fernandez-Lozano C. (2021): **A review on machine learning approaches and trends in drug discovery**. *Computational and structural biotechnology journal*, 19. 4538–4558.
- Cebul R. D., Hershey J. C., Williams S. V. és mtsai. (1982): **Using multiple tests: series and parallel approaches**. *Clin Lab Med*, 2. 871–890.
- Çevik K. K. (2020): **Deep Learning Based Real-Time Body Condition Score Classification System**. *IEEE Access*, 8. 213950–213957.
- Chartrand G., Cheng P. M., Vorontsov E., Drozdal M., Turcotte S., Pal C. J., Kadoury S., Tang A. (2017): **Deep learning: a primer for radiologists**. *Radiographics*, 37. 2113–2131.
- Chen J., Li H., Yang J., Zhan R., Chen A., Yan Y. (2015): **Prevalence and characterization of integrons in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in Eastern China: a multiple-hospital study**. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12. 10093–10105.
- Chen J., Ying G.-G., Deng W.-J. (2019): **Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns**. *J. Agric. Food Chem.*, 67. 7569–7586.
- Cho S., Barrett J. B., Frye J. G., Jackson C. R. (2020): **Antimicrobial Resistance Gene Detection and Plasmid Typing Among Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Fresh-water Environment**. *Microorganisms*, 8. 1338.

- Christian H., Agus M. P., Suhartono D. (2016): **Single document automatic text summarization using term frequency-inverse document frequency (TF-IDF)**. *ComTech: Computer, Mathematics and Engineering Applications*, 7. 285–294.
- Cobirka M., Tancin V., Slama P. (2020): **Epidemiology and classification of mastitis**. *Animals*, 10. 2212.
- Cockburn M. (2020): **Application and prospective discussion of machine learning for the management of dairy farms**. *Animals*, 10. 1690.
- Cohen J. (1960): **A coefficient of agreement for nominal scales**. *Educ. Psychol. Meas.*, 20. 37–46.
- Dahl D. B., Scott D., Roosen C., Magnusson A., Swinton J. (2019): **xtable: Export Tables to LaTeX or HTML**. R package version 1.8-4.
- Dec M., Nowaczek A., Stępień-Pyśniak D., Wawrzykowski J., Urban-Chmiel R. (2018): **Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys**. *BMC Microbiol.*, 18. 168.
- Dingwell R. T., Leslie K. E., Schukken Y. H., Sargeant J. M., Timms L. L. (2003): **Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows**. *Can. Vet. J.*, 44. 413.
- Do S., Song K. D., Chung J. W. (2020): **Basics of deep learning: a radiologist's guide to understanding published radiology articles on deep learning**. *Korean J. Radiol.*, 21. 33–41.
- Doupe P., Faghmous J., Basu S. (2019): **Machine learning for health services researchers**. *Value in Health*, 22. 808–815.
- Driehuis F., Spanjer M., Scholten J., Te Giffel M. (2008): **Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands**. *Food Addit. Contam.*, 1. 41–50.
- Du N., Liu S., Niu M., Duan Y., Zhang S., Yao J., Mao J., Chen R., Du Y. (2017): **Transmission and characterization of bla NDM-1 in *Enterobacter cloacae* at a teaching hospital in Yunnan, China**. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 16. 58.
- Dunière L., Sindou J., Chaucheyras-Durand F., Chevallier I., Thévenot-Sergentet D. (2013): **Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms**. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 182. 1–15.
- Eastridge M. (2006): **Major advances in applied dairy cattle nutrition**. *J. Dairy Sci.*, 89. 1311–1323.
- Ebrahimi M., Mohammadi-Dehcheshmeh M., Ebrahimie E., Petrovski K. R. (2019): **Comprehensive analysis of machine learning models for prediction of sub-clinical mastitis: Deep Learning and Gradient-Boosted Trees outperform other models**. *Comput. Biol. Med.*, 114. 103456.

- Edmonson A., Lean I., Weaver L., Farver T., Webster G. (1989): **A body condition scoring chart for Holstein dairy cows.** *J. Dairy Sci.*, 72. 68–78.
- Eida A. A., Bougouffa S., L'Haridon F., Alam I., Weisskopf L., Bajic V. B., Saad M. M., Hirt H. (2020): **Genome insights of the plant-growth promoting bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatile-mediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans*.** *Front. Microbiol.*, 11.
- EMA (2020): **Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018.** EMA/24309/2020.
- FDA (2020): **Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.** US Department of Health and Human Services.
- Ferguson J. D., Galligan D. T., Thomsen N. (1994): **Principal descriptors of body condition score in Holstein cows.** *J. Dairy Sci.*, 77. 2695–2703.
- Ferrero F., Valledor M., Campo J. (2014): **Screening method for early detection of mastitis in cows.** *Measurement*, 47. 855–860.
- Feyereisen M., Mahony J., Kelleher P., Roberts R. J., O'Sullivan T., Geertman J.-M. A., Sinderen D. van (2019): **Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species.** *BMC Genom.*, 20. 416.
- Fisher R. A., Gollan B., Helaine S. (2017): **Persistent bacterial infections and persister cells.** *Nat. Rev. Microbiol.*, 15. 453–464.
- Fosgate G. T., Petzer I.-M., Karzis J. (2013): **Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle.** *Vet. J.*, 196. 98–102.
- Founou L. L., Founou R. C., Essack S. Y. (2016): **Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective.** *Front. Microbiol.*, 7. 1881.
- Ghurye J. S., Cepeda-Espinoza V., Pop M. (2016): **Focus: microbiome: metagenomic assembly: overview, challenges and applications.** *Yale J. Biol. Med.*, 89. 353.
- Girshick R., Donahue J., Darrell T., Malik J. (2015): **Region-based convolutional networks for accurate object detection and segmentation.** *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 38. 142–158.
- Goelzer A., Fromion V. (2011): **Bacterial growth rate reflects a bottleneck in resource allocation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810. 978–988.
- Goh S. (2016): **Clostridium difficile: Methods and Protocols.** Szerk. A. P. Roberts, P. Mul-lany. Springer New York. Phage Transduction, 177–185. old.
- Gohary K., McDougall S. (2018): **Predicting intramammary infection status at drying off using indirect testing of milk samples.** *N. Z. Vet. J.*, 66. 312–318.
- Goodswen S. J., Barratt J. L., Kennedy P. J., Kaufer A., Calarco L., Ellis J. T. (2021): **Machine learning and applications in microbiology.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 45. fuab015.

- Greener J. G., Kandathil S. M., Moffat L., Jones D. T. (2022): **A guide to machine learning for biologists**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23. 40–55.
- Guo J., Bolduc B., Zayed A. A., Varsani A., Dominguez-Huerta G., Delmont T. O., Pratama A. A., Gazitúa M. C., Vik D., Sullivan M. B. és mtsai. (2021): **VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses**. *Microbiome*, 9. 37.
- Halachmi I., Guarino M., Bewley J., Pastell M. (2019): **Smart animal agriculture: application of real-time sensors to improve animal well-being and production**. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 7. 403–425.
- Hammerum A. M., Sandvang D., Andersen S. R., Seyfarth A. M., Porsbo L. J., Frimodt-Møller N., Heuer O. E. (2006): **Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark**. *Int. J. Food Microbiol.*, 106. 235–237.
- Han X., Zhang Z., Ding N., Gu Y., Liu X., Huo Y., Qiu J., Yao Y., Zhang A., Zhang L. és mtsai. (2021): **Pre-trained models: Past, present and future**. *AI Open*, 2. 225–250.
- Hao W., Shan X., Li D., Schwarz S., Zhang S.-M., Li X.-S., Du X.-D. (2019): **Analysis of a poxtA-and oprA-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis***. *J. Antimicrob. Chemother.*, 74. 1771–1775.
- Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K. (2005): **Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49. 801–803.
- Hauschild T., Sacha P., Wieczorek P., Zalewska M., Kaczyńska K., Trynieszewska E. (2008): **Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Białystok, Poland**. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 46. 225–228.
- Helm J. M., Swiergosz A. M., Haeberle H. S., Karnuta J. M., Schaffer J. L., Krebs V. E., Spitzer A. I., Ramkumar P. N. (2020): **Machine learning and artificial intelligence: definitions, applications, and future directions**. *Curr. Rev. Musculoskelet.*, 13. 69–76.
- Hiitiö H., Vakkamäki J., Simojoki H., Autio T., Junnila J., Pelkonen S., Pyörälä S. (2017): **Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors**. *Acta Vet. Scand.*, 59. 1–14.
- Huang Z., Zhou X., Stanton C., Ross R. P., Zhao J., Zhang H., Yang B., Chen W. (2021): **Comparative Genomics and Specific Functional Characteristics Analysis of *Lactobacillus acidophilus***. *Microorganisms*, 9. 1992.
- Hyatt D., Chen G.-L., LoCascio P. F., Land M. L., Larimer F. W., Hauser L. J. (2010): **Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification**. *BMC Bioinform.*, 11. 119.
- Indugu N., Sharma L., Jackson C. R., Singh P. (2020): **Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from imported retail shrimp**. *Microbiol. Resour. Announc.*, 9. e01103–20.

- Jaimee G., Halami P. (2017): **Conjugal transfer of aac(6')Ie-aph(2'')Ia gene from native species and mechanism of regulation and cross resistance in *Enterococcus faecalis* MCC3063 by real time-PCR.** *Microb. Pathog.*, 110. 546–553.
- Jakhar D., Kaur I. (2020): **Artificial intelligence, machine learning and deep learning: definitions and differences.** *Clin. Exp. Dermatol.*, 45. 131–132.
- Janzekovic M., Brus M., Mursec B., Vinis P., Stajanko D., Cus F. (2009): **Mastitis detection based on electric conductivity of milk.** *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.*, 34. 39–46.
- Ji S., Jiang T., Yan H., Guo C., Liu J., Su H., Alugongo G. M., Shi H., Wang Y., Cao Z. és mtsai. (2018): **Ecological restoration of antibiotic-disturbed gastrointestinal microbiota in foregut and hindgut of cows.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 8. 79.
- Jia B., Raphenya A. R., Alcock B., Waglechner N., Guo P., Tsang K. K., Lago B. A., Dave B. M., Pereira S., Sharma A. N., Doshi S., Courtot M., Lo R., Williams L. E., Frye J. G., Elsayegh T., Sardar D., Westman E. L., Pawlowski A. C., Johnson T. A., Brinkman F. S., Wright G. D., McArthur A. G. (2017): **CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database.** *Nucleic Acids Res.*, 45. D566–D573.
- Johansson M. H., Bortolaia V., Tansirichaiya S., Aarestrup F. M., Roberts A. P., Petersen T. N. (2021): **Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 76. 101–109.
- Kandeel S., Megahed A., Arnaout F., Constable P. (2018): **Evaluation and Comparison of 2 On-Farm Tests for Estimating Somatic Cell Count in Quarter Milk Samples from Lactating Dairy Cattle.** *J. Vet. Intern. Med.*, 32. 506–515.
- Khasanah H., Setyawan H. B., Yulianto R., Widianingrum D. C. (2021): **Subclinical mastitis: Prevalence and risk factors in dairy cows in East Java, Indonesia.** *Vet. World*, 14. 2102.
- Khota W., Pholsen S., Higgs D., Cai Y. (2016): **Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant.** *J. Dairy Sci.*, 99. 9768–9781.
- Kingsford C., Salzberg S. L. (2008): **What are decision trees?:** *Nature biotechnology*, 26. 1011–1013.
- Kleen J. L., Guatteo R. (2023): **Precision Livestock Farming: What Does It Contain and What Are the Perspectives?:** *Animals*, 13. 779.
- Kleene S. C. (1956): **Representation of Events in Nerve Nets and Finite Automata.** *Automata Studies. (AM-34), Volume 34.* Szerk. C. E. Shannon, J. McCarthy. Princeton: Princeton University Press, 3–42. old.
- Kowalski Z., Górka P., Schlagheck A., Jagusiak W., Micek P., Strzetelski J. és mtsai. (2009): **Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive.** *J. Anim. Feed Sci.*, 18. 399–411.

- Krawczyk P. S., Lipinski L., Dziembowski A. (2018): **PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures**. *Nucleic Acids Res.*, 46. e35.
- Krikó E., Farkas R., Adorján A., Makrai L., Solymosi N. (2018): **Metagenomika - a velünk élő mikroorganizmusok megismerésének új megközelítése**. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 140. 423–429.
- Kristensen E., Dueholm L., Vink D., Andersen J., Jakobsen E., Illum-Nielsen S., Petersen F., Enevoldsen C. (2006): **Within-and across-person uniformity of body condition scoring in Danish Holstein cattle**. *J. Dairy Sci.*, 89. 3721–3728.
- Krömker V., Leimbach S. (2017): **Mastitis treatment – Reduction in antibiotic usage in dairy cows**. *Reprod. Domest. Anim.*, 52. 21–29.
- Krukowski M. (2009): **Automatic determination of body condition score of dairy cows from 3D images**. Skolan för datavetenskap och kommunikation, Kungliga Tekniska högskolan.
- Kuhn M. (2023): **caret: Classification and regression training**. R package version 6.0-93.
- Lachowska M., Izdebski R., Urbanowicz P., Żabicka D., Królak-Olejnik B. (2021): **Infection of *Cronobacter sakazakii* ST1 Producing SHV-12 in a Premature Infant Born from Triplet Pregnancy**. *Microorganisms*, 9. 1878.
- Lahti L., Shetty S. (2012-2019): **microbiome R package**.
- Landers T. F., Cohen B., Wittum T. E., Larson E. L. (2012): **A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential**. *Public Health Rep.*, 127. 4–22.
- Lei C.-W., Chen X., Liu S.-Y., Li T.-Y., Chen Y., Wang H.-N. (2021): **Clonal spread and horizontal transfer mediate dissemination of phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxTA* in enterococci isolates from a swine farm in China**. *Vet. Microbiol.*, 262. 109219.
- Levin-Reisman I., Fridman O., Balaban N. Q. (2014): **ScanLag: high-throughput quantification of colony growth and lag time**. *J. Visualized Exp.* .
- Levin-Reisman I., Gefen O., Fridman O., Ronin I., Shwa D., Sheftel H., Balaban N. Q. (2010): **Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes**. *Nat. methods*, 7. 737–739.
- Li D., Liu C.-M., Luo R., Sadakane K., Lam T.-W. (2015): **MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph**. *Bioinformatics*, 31. 1674–1676.
- Li Y., Nishino N. (2011): **Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri***. *J. Appl. Microbiol.*, 110. 1561–1570.
- Liakos K. G., Busato P., Moshou D., Pearson S., Bochtis D. (2018): **Machine learning in agriculture: A review**. *Sensors*, 18. 2674.
- Liao X., Li M., Zou Y., Wu F.-X., Wang J. (2019): **Current challenges and solutions of de novo assembly**. *Quantitative Biology*, 7. 90–109.

- Lindqvist R. (2006): **Estimation of Staphylococcus aureus growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 72. 4862–4870.
- Liu J., Taft D. H., Maldonado-Gomez M. X., Johnson D., Treiber M. L., Lemay D. G., DePeters E. J., Mills D. A. (2019): **The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing.** *Nat. Commun.*, 10. 4406.
- Lloyd K. K., Khanna C., Hendricks W., Trent J., Kotlikoff M. (2016): **Precision medicine: an opportunity for a paradigm shift in veterinary medicine.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 248. 45–48.
- Madrid R. E., Felice C. J., Valentinuzzi M. E. (1999): **Automatic on-line analyser of microbial growth using simultaneous measurements of impedance and turbidity.** *Med. Biol. Eng. Comput.*, 37. 789–793.
- Majchrowska S., Pawłowski J., Guła G., Bonus T., Hanas A., Loch A., Pawlak A., Roszkowiak J., Golan T., Drulis-Kawa Z. (2021): **AGAR a microbial colony dataset for deep learning detection.** *arXiv preprint arXiv:2108.01234*.
- Mak J. K., Kim M.-J., Pham J., Tapsall J., White P. A. (2009): **Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *J. Antimicrob. Chemoth.*, 63. 47–54.
- Makrai L., Fodróczy B., Nagy S. Á., Czeiszing P., Csabai I., Szita G., Solymosi N. (2023): **Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection.** *Scientific Data*, 10. 497.
- Malbruny B., Werno A. M., Murdoch D. R., Leclercq R., Cattoir V. (2011): **Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the *Isa (C)* gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55. 1470–1474.
- Maleki F., Muthukrishnan N., Ovens K., Reinhold C., Forghani R. (2020): **Machine learning algorithm validation: from essentials to advanced applications and implications for regulatory certification and deployment.** *Neuroimaging Clin. N. Am.*, 30. 433–445.
- Mammadova N. M., Keskin I. (2015): **Application of neural network and adaptive neuro-fuzzy inference system to predict subclinical mastitis in dairy cattle.** *Indian J. Anim. Res.*, 49. 671–679.
- Mamuad L. L., Kim S. H., Biswas A. A., Yu Z., Cho K.-K., Kim S.-B., Lee K., Lee S. S. (2019): **Rumen fermentation and microbial community composition influenced by live *Enterococcus faecium* supplementation.** *AMB Expr.*, 9. 123.
- Mao Y.-C., Chang C.-L., Huang Y.-C., Su L.-H., Lee C.-T. (2018): **Laboratory investigation of a suspected outbreak caused by *Providencia stuartii* with intermediate resistance to imipenem at a long-term care facility.** *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 51. 214–219.
- Marshall R. J. (1989): **The predictive value of simple rules for combining two diagnostic tests.** *Biometrics*. 1213–1222.

- Martínez J. L. (2008): **Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments.** *Science*, 321. 365–367.
- McAllister T., Dunière L., Drouin P., Xu S., Wang Y., Munns K., Zaheer R. (2018): **Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage.** *J. Dairy Sci.*, 101. 4060–4074.
- McArthur A. G., Waglechner N., Nizam F., Yan A., Azad M. A., Baylay A. J., Bhullar K., Canova M. J., De Pascale G., Ejim L., Kalan L., King A. M., Koteva K., Morar M., Mulvey M. R., O'Brien J. S., Pawlowski A. C., Piddock L. J. V., Spanogiannopoulos P., Sutherland A. D., Tang I., Taylor P. L., Thaker M., Wang W., Yan M., Yu T., Wright G. D. (2013): **The comprehensive antibiotic resistance database.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57. 3348–3357.
- McCulloch W. S., Pitts W. (1943): **A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity.** *Bull. Math. Biophys.*, 5. 115–133.
- McHugh M. L. (2012): **Interrater reliability: the kappa statistic.** *Biochem. Med.*, 22. 276–282.
- McMeekin T., Brown J., Krist K., Miles D., Neumeyer K., Nichols D., Olley J., Presser K., Ratkowsky D., Ross T. és mtsai. (1997): **Quantitative microbiology: a basis for food safety.** *Emerg. Infect. Dis.*, 3. 541.
- McMurdie P. J., Holmes S. (2013): **phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.** *PLoS ONE*, 8. e61217.
- Monteiro A., Santos S., Gonçalves P. (2021): **Precision agriculture for crop and livestock farming—Brief review.** *Animals*, 11. 2345.
- Morrow D. A. (1976): **Fat cow syndrome.** *J. Dairy Sci.*, 59. 1625–1629.
- Mullins I. L., Truman C. M., Campler M. R., Bewley J. M., Costa J. H. (2019): **Validation of a commercial automated body condition scoring system on a commercial dairy farm.** *Animals*, 9. 287.
- Na S.-H., Moon D.-C., Kim M.-H., Kang H.-Y., Kim S.-J., Choi J.-H., Mechesso A.-F., Yoon S.-S., Lim S.-K. (2020): **Detection of the phenicol–oxazolidinone resistance gene *poxta* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from food-producing animals during 2008–2018 in Korea.** *Microorganisms*, 8. 1839.
- Nagy S. Á., Csabai I., Varga T., Póth-Szebenyi B., Gábor G., Solymosi N. (2023a): **Mesterséges neurális hálózatok az állatitermék-előállításban.** *Magy. Állatorvosok Lapja*, 145. 309–319.
- (2023b): **Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction.** PREPRINT (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2865554/v1>).
- Nagy S. Á., Kilim O., Csabai I., Gábor G., Solymosi N. (2023c): **Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction.** *Animals*, 13. 194.

- Nagy S. Á., Makrai L., Csabai I., Tózsér D., Szita G., Solymosi N. (2023d): **Bacterial colony size growth estimation by deep learning**. PREPRINT (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.04.25.538361v1>).
- Nagy S. Á., Tóth A. G., Papp M., Kaplan S., Solymosi N. (2022): **Antimicrobial resistance determinants in silage**. *Sci. Rep.*, 12. 1–10.
- Nagy S. Á., Tózsér D., Szombath G., Baranyi D., Reibling T., Biksi I., Solymosi N. (2017): **Statisztikai ellenőrző diagramok az állattermék-előállításban**. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 139. 515–523.
- Nayeri S., Sargolzaei M., Tulpan D. (2019): **A review of traditional and machine learning methods applied to animal breeding**. *Anim. Health Res. Rev.*, 20. 31–46.
- Nicholson T. L., Waack U., Anderson T. K., Bayles D. O., Zaia S. R., Goertz I., Eppinger M., Hau S. J., Brockmeier S. L., Shore S. M. (2021): **Comparative Virulence and Genomic Analysis of *Streptococcus suis* Isolates**. *Front. Microbiol.*, 11. 3563.
- Noor Uddin G. M., Larsen M. H., Christensen H., Aarestrup F. M., Phu T. M., Dalsgaard A. (2015): **Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture**. *PLoS ONE*, 10. e0132338.
- Ogunade I., Jiang Y., Cervantes A. P., Kim D., Oliveira A., Vyas D., Weinberg Z., Jeong K., Adesogan A. (2018): **Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives**. *J. Dairy Sci.*, 101. 2048–2059.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., Almeida R. A. (2005): **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications**. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2. 115–129.
- Paradhipta D. H. V., Lee S. S., Kang B., Joo Y. H., Lee H. J., Lee Y., Kim J., Kim S. C. (2020): **Dual-purpose inoculants and their effects on corn silage**. *Microorganisms*, 8. 765.
- Pawłowski J., Majchrowska S., Golan T. (2022): **Generation of microbial colonies dataset with deep learning style transfer**. *Sci. Rep.*, 12. 5212.
- Pebesma E. (2018): **Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data**. *R J.*, 10. 439–446.
- Perez P. F., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin E. J., Donnet-Hughes A. (2007): **Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?** *Pediatrics*, 119. e724–e732.
- Pesapane F., Codari M., Sardanelli F. (2018): **Artificial intelligence in medical imaging: threat or opportunity? Radiologists again at the forefront of innovation in medicine**. *Eur. Radio. Exp.*, 2. 1–10.
- Pitta D. W., Indugu N., Toth J. D., Bender J. S., Baker L. D., Hennessy M. L., Vecchiarelli B., Aceto H., Dou Z. (2020): **The distribution of microbiomes and resistomes across farm environments in conventional and organic dairy herds in Pennsylvania**. *Environmental Microbiome*, 15. 1–13.

- Plozza K., Lievaart J., Potts G., Barkema H. (2011): **Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales**. *Aust. Vet. J.*, 89. 41–46.
- Pokharel S., Shrestha P., Adhikari B. (2020): **Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement ‘One Health’ approach**. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 9. 181.
- Pusponegoro N. H., Notodiputro K. A., Sartono B. és mtsai. (2017): **Linear mixed model for analyzing longitudinal data: A simulation study of children growth differences**. *Procedia computer science*, 116. 284–291.
- R Core Team (2022): **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Raschle S., Stephan R., Stevens M. J., Cernela N., Zurfluh K., Muchaamba F., Nüesch-Inderbinnen M. (2021): **Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland**. *Sci. Rep.*, 11. 9066.
- Ren S., He K., Girshick R., Sun J. (2015): „Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks”. *Proceedings of the 28th International Conference on Neural Information Processing Systems - Volume 1*. NIPS’15. Montreal, Canada: MIT Press, 91–99. old.
- Rezatofighi H., Tsoi N., Gwak J., Sadeghian A., Reid I., Savarese S. (2019): „Generalized intersection over union: A metric and a loss for bounding box regression”. *Proceedings of the IEEE/CVF conference on computer vision and pattern recognition*, 658–666. old.
- Ripley B. D. (2007): **Pattern recognition and neural networks**. Cambridge university press.
- Robinson D., Hayes A., Couch S. (2023): **broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles**. R package version 1.0.4.
- Roche J. R., Kay J. K., Friggens N. C., Loor J. J., Berry D. P. (2013): **Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows**. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*, 29. 323–336.
- Roche J., Dillon P., Stockdale C., Baumgard L., VanBaale M. (2004): **Relationships among international body condition scoring systems**. *J. Dairy Sci.*, 87. 3076–3079.
- Rodriguez A. V., Baigoré M. D., Alvarez S., Castro G. R., Oliver G. (2001): **Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate**. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204. 33–38.
- Rodríguez J. M. (2014): **The origin of human milk bacteria: is there a bacterial enteromammary pathway during late pregnancy and lactation?** *Adv. Nutr.*, 5. 779–784.
- Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2006): **Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine**. *Int. J. Food Microbiol.*, 111. 234–240.
- Ruegg P., Pantoja J. (2013): **Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality**. *Ir. J. Agric. Food Res.*, 52. 101–117.

- Russell S. J. (2010): **Artificial intelligence a modern approach**. Pearson Education, Inc.
- Sanford C., Keefe G. P., Sanchez J., Dingwell R., Barkema H., Leslie K., Dohoo I. R. (2006): **Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test**. *Prev. Vet. Med.*, 77. 96–108.
- Sarker I. H. (2021): **Machine learning: Algorithms, real-world applications and research directions**. *SN Comput. Sci.*, 2. 1–21.
- Sawant A., Sordillo L., Jayarao B. (2005): **A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania**. *J. Dairy Sci.*, 88. 2991–2999.
- Schalm O., Noorlander D. (1957): **Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test**. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 130. 199–204.
- Schwarz D., Lipkens Z., Piepers S., De Vliegher S. (2019): **Investigation of differential somatic cell count as a potential new supplementary indicator to somatic cell count for identification of intramammary infection in dairy cows at the end of the lactation period**. *Prev. Vet. Med.*, 172. 104803.
- Shelley A. N. (2016): **Incorporating machine vision in precision dairy farming technologies**. University of Kentucky.
- Shigeta M., Ike R., Takemura H., Ohwada H. (2018): **Automatic measurement and determination of body condition score of cows based on 3D images using CNN**. *J. Robot. Mechatron.*, 30. 206–213.
- Sieber P., Platzer M., Schuster S. (2018): **The definition of open reading frame revisited**. *Trends in Genetics*, 34. 167–170.
- Silva S. R., Araujo J. P., Guedes C., Silva F., Almeida M., Cerqueira J. L. (2021): **Precision technologies to address dairy cattle welfare: focus on lameness, mastitis and body condition**. *Animals*, 11. 2253.
- Sims D., Sudbery I., Illott N. E., Heger A., Ponting C. P. (2014): **Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses**. *Nat. Rev. Genet.*, 15. 121–132.
- Slob N., Catal C., Kassahun A. (2021): **Application of machine learning to improve dairy farm management: A systematic literature review**. *Prev. Vet. Med.*, 187. 105237.
- Smith G. (2015): **Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle**. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 31. 47–60.
- Soltani M., Beighton D., Philpott-Howard J., Woodford N. (2000): **Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44. 433–436.
- Song X., Bokkers E., Van Mourik S., Koerkamp P. G., Van Der Tol P. (2019): **Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions**. *J. Dairy Sci.*, 102. 4294–4308.

- Song Z., Chen Q., Huang Z., Hua Y., Yan S. (2011): „Contextualizing object detection and classification”. *CVPR 2011*. IEEE, 1585–1592. old.
- Spoliansky R., Edan Y., Parmet Y., Halachmi I. (2016): **Development of automatic body condition scoring using a low-cost 3-dimensional Kinect camera**. *J. Dairy Sci.*, 99. 7714–7725.
- Stern J., Miller G., Li X., Saxena D. (2019): **Virome and bacteriome: two sides of the same coin**. *Curr. Opin. Virol.*, 37. 37–43.
- Strauss C., Hu Y., Coates A., Perreten V. (2016): **A Novel erm(44) gene variant from a human *Staphylococcus saprophyticus* isolate confers resistance to macrolides and lincosamides but not streptogramins**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61. e01655–16.
- Tao Y., Li F., Sun Y. (2022): **Development and implementation of a training dataset to ensure clear boundary value of body condition score classification of dairy cows in automatic system**. *Livest. Sci.*, 259. 104901.
- Tennekes M. (2018): **tmap: Thematic Maps in R**. *J. Stat. Softw.*, 84. 1–39.
- Thrusfield M., Christley R. (2018): **Veterinary epidemiology**. 4th. Wiley. Diagnostic testing.
- Tkachenko M., Malyuk M., Holmanyuk A., Liubimov N. (2020-2022): **Label Studio: Data labeling software**. Open source software available from <https://github.com/heartexlabs/label-studio>.
- Tóth A. G., Csabai I., Judge M. F., Maróti G., Becsei Á., Spisák S., Solymosi N. (2021): **Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics**. *Antibiotics*, 10. 1287.
- Tóth A. G., Csabai I., Krikó E., Tózsér D., Maróti G., Patai Á. V., Makrai L., Szita G., Solymosi N. (2020a): **Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption**. *Sci. Rep.*, 10. 1–7.
- Tóth A. G., Csabai I., Maróti G., Jerzsele Á., Dubecz A., Patai Á. V., Judge M. F., Nagy S. Á., Makrai L., Bányai K. és mtsai. (2020b): **A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt**. *Sci. Rep.*, 10. 1–12.
- Tóth A. G., Judge M. F., Nagy S. Á., Papp M., Solymosi N. (2023): **A survey on antimicrobial resistance genes of frequently used probiotic bacteria, 1901 to 2022**. *Euro Surveill.*, 28. 2200272.
- Truman C. M., Campler M. R., Costa J. H. (2022): **Body Condition Score Change throughout Lactation Utilizing an Automated BCS System: A Descriptive Study**. *Animals*, 12. 601.
- Trzcinski K., Cooper B. S., Hryniewicz W., Dowson C. G. (2000): **Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45. 763–770.
- Tullo E., Finzi A., Guarino M. (2019): **Environmental impact of livestock farming and Precision Livestock Farming as a mitigation strategy**. *Sci. Total Environ.*, 650. 2751–2760.
- Umeda K., Nakamura H., Fukuda A., Yamaguchi T., Matsumoto Y., Motooka D., Nakamura S., Kawahara R. (2020): **Molecular characterization of bla KHM-1 encoding plasmid in an**

- Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* isolate from blood culture.** *PLoS ONE*, 15. e0227605.
- Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A., Laxminarayan R. (2015): **Global trends in antimicrobial use in food animals.** *PNAS*, 112. 5649–5654.
- Van Boeckel T. P., Pires J., Silvester R., Zhao C., Song J., Criscuolo N. G., Gilbert M., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. (2019): **Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries.** *Science*, 365. eaaw1944.
- Visual Object Tagging Tool (VoTT)** (2020). <https://github.com/microsoft/VoTT>. 2.2.0. verzió.
- Vulin C., Leimer N., Huemer M., Ackermann M., Zinkernagel A. S. (2018): **Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters.** *Nat. Commun.*, 9. 4074.
- Wagner M. W., Namdar K., Biswas A., Monah S., Khalvati F., Ertl-Wagner B. B. (2021): **Radiomics, machine learning, and artificial intelligence—what the neuroradiologist needs to know.** *Neuroradiol.* 1–11.
- Wang H., Qi J.-F., Qin R., Ding K., Graham D. W., Zhu Y.-G. (2023): **Intensified livestock farming increases antibiotic resistance genotypes and phenotypes in animal feces.** *Communications Earth & Environment*, 4. 123.
- Wang Y., Kang X., He Z., Feng Y., Liu G. (2022): **Accurate detection of dairy cow mastitis with deep learning technology: a new and comprehensive detection method based on infrared thermal images.** *Animal*, 16. 100646.
- Wathes C. M., Kristensen H. H., Aerts J.-M., Berckmans D. (2008): **Is precision livestock farming an engineer's daydream or nightmare, an animal's friend or foe, and a farmer's panacea or pitfall?:** *Comput. Electron. Agric.*, 64. 2–10.
- Wendlandt S., Heß S., Li J., Feßler A. T., Wang Y., Kadlec K., Gallert C., Schwarz S. (2015): **Detection of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm* (44) and a novel *erm* (44) variant in staphylococci from aquatic environments.** *FEMS Microbiol. Ecol.*, 91. fiv090.
- Wickham H. (2016): **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** Springer-Verlag New York.
- Woegerbauer M., Kuffner M., Domingues S., Nielsen K. M. (2015): **Involvement of *aph(3)-IIa* in the formation of mosaic aminoglycoside resistance genes in natural environments.** *Front. Microbiol.*, 6. 442.
- Wood D. E., Lu J., Langmead B. (2019): **Improved metagenomic analysis with Kraken 2.** *Genome Biol.*, 20. 257.
- Word A., Wickersham T., Trubenbach L., Mays G., Sawyer J. (2020): **Effects of metaphylaxis on production responses and total antimicrobial use in high-risk beef calves.** *Appl. Anim. Behav.*, 36. 265–270.

- Wu Y., Kirillov A., Massa F., Lo W.-Y., Girshick R. (2019): **Detectron2**. <https://github.com/facebookresearch/detectron2>.
- Xu Z., He H., Zhang S., Kong J. (2017): **Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage**. *Sci. Rep.*, 7. 13614.
- Yamakawa T., Miyajima M., Fujiwara K., Kano M., Suzuki Y., Watanabe Y., Watanabe S., Hoshida T., Inaji M., Maehara T. (2020): **Wearable epileptic seizure prediction system with machine-learning-based anomaly detection of heart rate variability**. *Sensors*, 20. 3987.
- Yang X., Zhang S., Liu J., Gao Q., Dong S., Zhou C. (2021): **Deep learning for smart fish farming: applications, opportunities and challenges**. *Rev. Aquac.*, 13. 66–90.
- Yelin I., Flett K. B., Merakou C., Mehrotra P., Stam J., Snesrud E., Hinkle M., Lesho E., McGann P., McAdam A. J. és mtsai. (2019): **Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients**. *Nat. Med.*, 25. 1728–1732.
- Young W., Hine B. C., Wallace O. A., Callaghan M., Bibiloni R. (2015): **Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow**. *PeerJ*, 3. e888.
- Yu J., Yang B., Wang J., Leader J., Wilson D., Pu J. (2020): **2D CNN versus 3D CNN for false-positive reduction in lung cancer screening**. *J. Med. Imaging*, 7. 051202–051202.
- Yukun S., Pengju H., Yujie W., Ziqi C., Yang L., Baisheng D., Runze L., Yonggen Z. (2019): **Automatic monitoring system for individual dairy cows based on a deep learning framework that provides identification via body parts and estimation of body condition score**. *J. Dairy Sci.*, 102. 10140–10151.
- Zaheer R., Cook S. R., Barbieri R., Goji N., Cameron A., Petkau A., Polo R. O., Tymensen L., Stamm C., Song J. és mtsai. (2020): **Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum**. *Sci. Rep.*, 10. 3937.
- Zakaria A. S., Kassem M. A., El Far M. S., Edward E. A. (2021): **Characterization, in-vitro evaluation of probiotic potential and antagonistic activity of selected lactic acid bacteria strains isolated from natural origin against some human pathogens**. *Bull. Pharm. Sci.*, 44. 225–241.
- Zhao K., Zhang M., Shen W., Liu X., Ji J., Dai B., Zhang R. (2023): **Automatic body condition scoring for dairy cows based on efficient net and convex hull features of point clouds**. *Comput. Electron. Agric.*, 205. 107588.
- Zhao S., Wang Y., Yang F., Wang Y., Zhang H. (2020): **Screening a *Lactobacillus plantarum* strain for good adaption in alfalfa ensiling and demonstrating its improvement of alfalfa silage quality**. *J. Appl. Microbiol.*, 129. 233–242.
- Zhuang M., Achmon Y., Cao Y., Liang X., Chen L., Wang H., Siame B. A., Leung K. Y. (2021): **Distribution of antibiotic resistance genes in the environment**. *Environ. Pollut.*, 285. 117402.

A doktori kutatás eredményeinek közlései

- Makrai L., Fodróczy B., Nagy S. Á., Czeiszing P., Csabai I., Szita G., Solymosi N. (2023): **Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection.** *Scientific Data*, 10. 497.
- Nagy S. Á., Csabai I., Varga T., Póth-Szebenyi B., Gábor G., Solymosi N. (2023a): **Mesterséges neurális hálózatok az állatitermék-előállításban.** *Magy. Állatorvosok Lapja*, 145. 309–319.
- (2023b): **Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction.** PREPRINT (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2865554/v1>).
- Nagy S. Á., Kilim O., Csabai I., Gábor G., Solymosi N. (2023c): **Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction.** *Animals*, 13. 194.
- Nagy S. Á., Makrai L., Csabai I., Tőzsér D., Szita G., Solymosi N. (2023d): **Bacterial colony size growth estimation by deep learning.** PREPRINT (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.04.25.538361v1>).
- Nagy S. Á., Tóth A. G., Papp M., Kaplan S., Solymosi N. (2022): **Antimicrobial resistance determinants in silage.** *Sci. Rep.*, 12. 1–10.
- Nagy S. Á., Tőzsér D., Szombath G., Baranyi D., Reibling T., Biksi I., Solymosi N. (2017): **Statisztikai ellenőrző diagramok az állatitermék-előállításban.** *Magy. Állatorvosok Lapja*, 139. 515–523.

A dolgozat alapját képező teljes terjedelmű közlemények

10.1. Antimicrobial resistance determinants in silage

www.nature.com/scientificreports

scientific reports



OPEN

Antimicrobial resistance determinants in silage

Sára Ágnes Nagy¹, Adrienn Gréta Tóth¹, Márton Papp¹, Selçuk Kaplan² & Norbert Solymosi¹✉

Animal products may play a role in developing and spreading antimicrobial resistance in several ways. On the one hand, residues of antibiotics not adequately used in animal farming can enter the human body via food. However, resistant bacteria may also be present in animal products, which can transfer the antimicrobial resistance genes (ARG) to the bacteria in the consumer's body by horizontal gene transfer. As previous studies have shown that fermented foods have a meaningful ARG content, it is indicated that such genes may also be present in silage used as mass feed in the cattle sector. In our study, we aspired to answer what ARGs occur in silage and what mobility characteristics they have? For this purpose, we have analyzed bioinformatically 52 freely available deep sequenced silage samples from shotgun metagenome next-generation sequencing. A total of 16 perfect matched ARGs occurred 54 times in the samples. More than half of these ARGs are mobile because they can be linked to integrative mobile genetic elements, prophages or plasmids. Our results point to a neglected but substantial ARG source in the food chain.

In intensive cattle farming, silage is an essential component of feed. An average dairy cow consumes 25–27 kg of this forage a day, reaching up to a silage consumption of 12,500 kg per lactation^{1,2}. Silage is most commonly produced from maize or legume plants by the process of anaerobic fermentation. Throughout the fermentation process, fermenting microorganisms, including bacteria, multiply. As a result of this biochemical transformation, the silage is enriched with beneficial nutrients. If bacteria that are involved in the process harbor antimicrobial resistance genes (ARGs), the amount of these genes in the silage will increase in parallel with the bacterial counts. Consequently, silage, as a mass feed may continuously supply the gastrointestinal tract of animals with bacteria carrying ARGs. Bacteria entering the digestive system may come into contact with the host microbiota that facilitates the exchange of bacterial genes (e.g. ARGs) by horizontal gene transfer (HGT). HGT may take place as a result of three different processes: conjugation, transduction and transformation. Except for transformation, by which a bacterium can take up any gene from its environment, the routes of HGT require particular active delivery processes. By conjugation, cell-to-cell contact provides the opportunity for a copy of a plasmid to translocate to a recipient bacterium³. Transduction negates the condition of cell-to-cell contact, as in this case, bacteriophages act as a conduit for shuttling genes among bacteria⁴. The genetic environment of the genes involved in the transfer significantly influences the efficacy of the latter two HGT processes, i.e., the genes' mobility. The reason why the mobility characteristics of ARGs involved in silage are worth taking into consideration is the following. If ARGs from silage are transmitted to pathogenic bacteria within an animal's body, efficacy of antibiotic (AB) treatment may be reduced on the consequent bacterial diseases. In addition, in case of the gut colonization of silage-borne bacteria that carry ARGs, the appearance and enrichment of bacterial ARGs may take place in the animals' environment after defecation. Decreased efficacy of AB treatments may result in economic loss, and the increased environmental ARG level may have additional veterinary and human health consequences. It is proven in former publications that the number of ARGs in fermented dairy products can increase due to the multiplication of fermenting bacteria⁵. Nevertheless, the description of this phenomenon cannot be found for silage in the literature. Our study aimed to examine the diversity, bacterial relatedness and mobility potential of ARGs deriving from silage. For this purpose, freely available next-generation sequencing (NGS) shotgun metagenome datasets were analyzed by a unified bioinformatics pipeline.

Results

Based on the taxon classification performed on a database containing complete reference genomes of plants, the most dominant plants in the silage belong to the *Medicago* genus and most likely to the alfalfa (*M. sativa*) species. Further results of the analysis of the 52 shotgun metagenomic sequenced samples (Table 2) are summarised in the following sections. After presenting the bacteriome and the identified ARGs (resistome), predictions

¹Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine Budapest, 1078 Budapest, Hungary. ²Department of Agricultural Biotechnology, Tekirdag Namik Kemal University, 59030 Tekirdag, Turkey. ✉email: solymosi.norbert@gmail.com

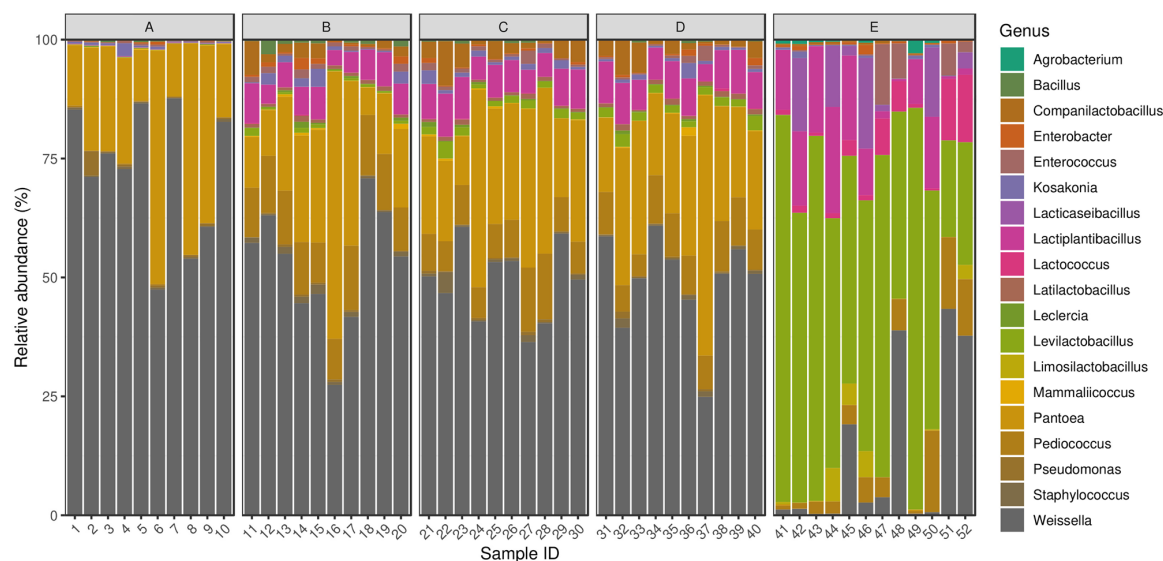


Figure 1. Silage core bacteriome. Relative abundances of genera that achieved more than 1% of the bacterial hits in any of the samples. The elements of the PRJNA495415 dataset were taken on days 0, 7, 14 and 28 were classified into groups A, B, C and D, respectively. All items from BioProject PRJNA764355 are assigned to group E.

regarding the mobility potential of ARGs were also resumed based on genetic characteristics that may play a significant role in HGT.

Bacteriome. By taxon classification, the number of reads aligning to bacterial genomes varied by samples (median: 20.6×10^6 , IQR: 2.9×10^6). The relative abundances of genera that achieved more than 1% of the bacterial hits in any of the samples are shown in Fig. 1.

The dominant bacterial genera (with mean abundance) in descending order were *Weissella* (45.7%), *Pantoea* (18.5%), *Levilactobacillus* (13.5%), *Pediococcus* (6.7%), *Lactiplantibacillus* (6.3%), *Companilactobacillus* (1.7%), *Lacticaseibacillus* (1.3%), *Enterococcus* (1.2%), *Lactococcus* (1%), *Kosakonia* (0.8%), *Staphylococcus* (0.6%), *Enterobacter* (0.5%), *Latilactobacillus* (0.5%), *Bacillus* (0.4%), *Limosilactobacillus* (0.4%), *Pseudomonas* (0.4%), *Leclercia* (0.2%), *Mammaliicoccus* (0.2%), *Agrobacterium* (0.1%).

Resistome. The median length of the filtered contigs harboring ARGs constructed by de novo assembly was 4,204 bp (IQR: 2,832). The number of ARGs found on the contigs ranged from 1 to 2. The identified 16 ARG types appeared 54 times in 20 of the analyzed 52 samples. These ARGs were the following: *aadA2*, *ant(6)-Ia*, *ant(9)-Ia*, *aph(3')-IIa*, *aph(3')-IIIa*, *dfrG*, *erm(44)v*, *lmrD*, *lsaE*, *poxA*, *qnrD1*, *qnrS1*, *sul1*, *sul2*, *tet(K)*, *vatE* (Fig. 2). The resistance mechanism of identified ARGs was the antibiotic inactivation (48.1%), antibiotic target protection (20.3%), antibiotic efflux (13.0%), antibiotic target alteration (9.3%), antibiotic target replacement (9.3%) in descending order of frequency. Table 1 shows the bacterial species to which the ARG harboring contigs were assigned based by the taxon classification. In addition, the table also presents which drug classes are affected by the ARGs.

Mobilome. We found a total of 53 ARGs that are assumably mobile. Ten of these ARGs are linked to integrative mobile genetic elements (iMGE). A further two ARGs were detected in prophages and forty-one on plasmids. The frequencies of ARGs associated with iMGEs, phages and plasmids are summarized in Fig. 3 by bacterial species of origin.

Following the distance method proposed by Johansson et al.⁶, integrated mobile genetic element associated ARGs were detected in five samples (30, 45, 46, 48, 52) and five species (*B. subtilis*, *E. hormaechei*, *E. faecium*, *L. paracasei*, *L. plantarum*). *B. subtilis* associated *aph(3')-IIa* in sample 30, and *poxA* of *E. faecium* in sample 45, of *L. plantarum* in sample 52, and of *L. paracasei* in sample 46 were detected as iMGE linked gene. *Sul1* and *aadA2* were detected in *E. hormaechei* co-existed with integrated mobile elements in sample 48. Two prophage-linked ARGs were identified, the contig harboring *erm(44)v* classified to *S. pseudoxylus* by VirSorter2 was found to be of dsDNA phage origin while the contig of *lsaE* from *S. suis* was predicted as ssDNA derived. These phage associated ARGs were detected in sample 37 and sample 45 respectively. Contigs with ARGs were predicted to belong to plasmids in 19 samples (Nr. 11, 12, 17, 30, 32, 36, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

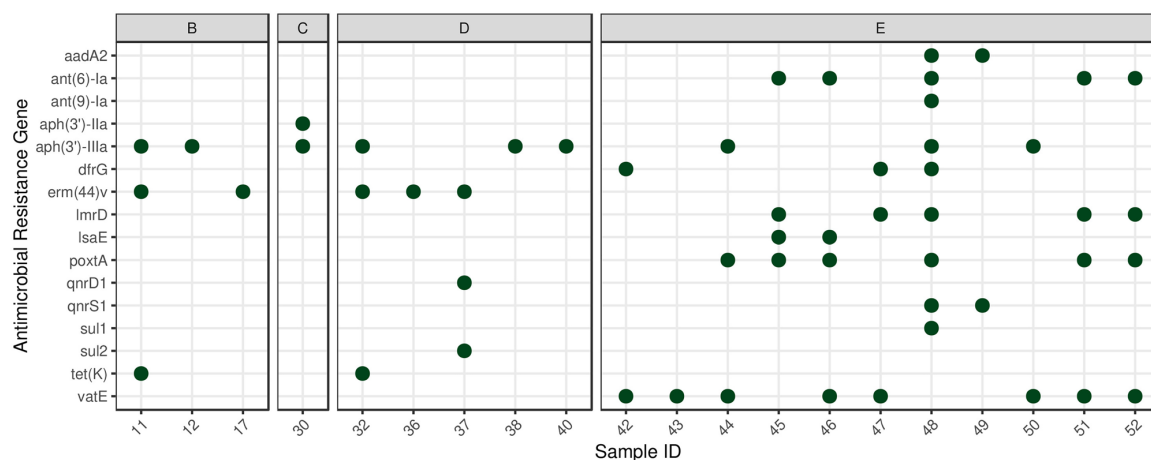


Figure 2. Identified antimicrobial resistance genes (ARGs) by samples. Perfect ARG matches were plotted by samples. The data of the PRJNA495415 taken on days 0, 7, 14 and 28 were classified in groups A, B, C and D, respectively. All samples from BioProject PRJNA764355 were assigned to group E.

Bacteria	ARG(s)	Drug class
<i>Acinetobacter baumannii</i>	aadA2	Aminoglycoside
<i>Amylolyticobacillus amylophilus</i>	ant(6)-Ia	Aminoglycoside
<i>Bacillus subtilis</i>	aph(3')-IIa	Aminoglycoside
<i>Cronobacter</i> sp. JZ38	qnrS1	Fluoroquinolone
<i>Enterobacter hormaechei</i>	aadA2, sul1	Aminoglycoside, sulfonamide
<i>Enterococcus faecalis</i>	aph(3')-IIIa	Aminoglycoside
<i>Enterococcus faecium</i>	poxA	Lincosamide, macrolide, oxazolidinone, phenicol, pleuromutilin, streptogramin, tetracycline
<i>Escherichia coli</i>	sul2	Sulfonamide
<i>Gracilibacillus</i> sp. SCU50	dfrG	Diaminopyrimidine
<i>Lactocaseibacillus manihotivorans</i>	ant(6)-Ia	Aminoglycoside
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	poxA	Lincosamide, macrolide, oxazolidinone, phenicol, pleuromutilin, streptogramin, tetracycline
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	aph(3')-IIIa, poxA, vatE	Aminoglycoside, lincosamide, macrolide, oxazolidinone, phenicol, pleuromutilin, streptogramin, tetracycline
<i>Lactococcus lactis</i>	lmrD	Lincosamide
<i>Levilactobacillus brevis</i>	poxA	Lincosamide, macrolide, oxazolidinone, phenicol, pleuromutilin, streptogramin, tetracycline
<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	ant(9)-Ia	Aminoglycoside
<i>Providencia rettgeri</i>	qnrD1	Fluoroquinolone
<i>Staphylococcus aureus</i>	ant(6)-Ia, tet(K)	Aminoglycoside, tetracycline
<i>Staphylococcus carnosus</i>	erm(44)v	Lincosamide, macrolide, streptogramin
<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i>	erm(44)v	Lincosamide, macrolide, streptogramin
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	erm(44)v	Lincosamide, macrolide, streptogramin
<i>Streptococcus suis</i>	lsaE	Lincosamide, macrolide, oxazolidinone, phenicol, pleuromutilin, streptogramin, tetracycline
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	aph(3')-IIIa	Aminoglycoside
<i>Weissella paramesenteroides</i>	ant(6)-Ia	Aminoglycoside

Table 1. Identified ARGs and the drug classes affected by them per bacterial species of origin.

Discussion

Throughout our study, numerous perfect ARG matches were identified in the metagenome of *Medicago* silage samples. All but group A of the analyzed subsets had at least one sample containing one or more ARG. Among the PRJNA495415 Bioproject samples, the highest number of ARGs were found in group D. The interpretation of this finding is limited due to the lack of detailed information on the samples. Interestingly, all but one of the PRJNA764355 bioproject samples contained ARGs. Due to the lack of metadata, it is hard to find any reason

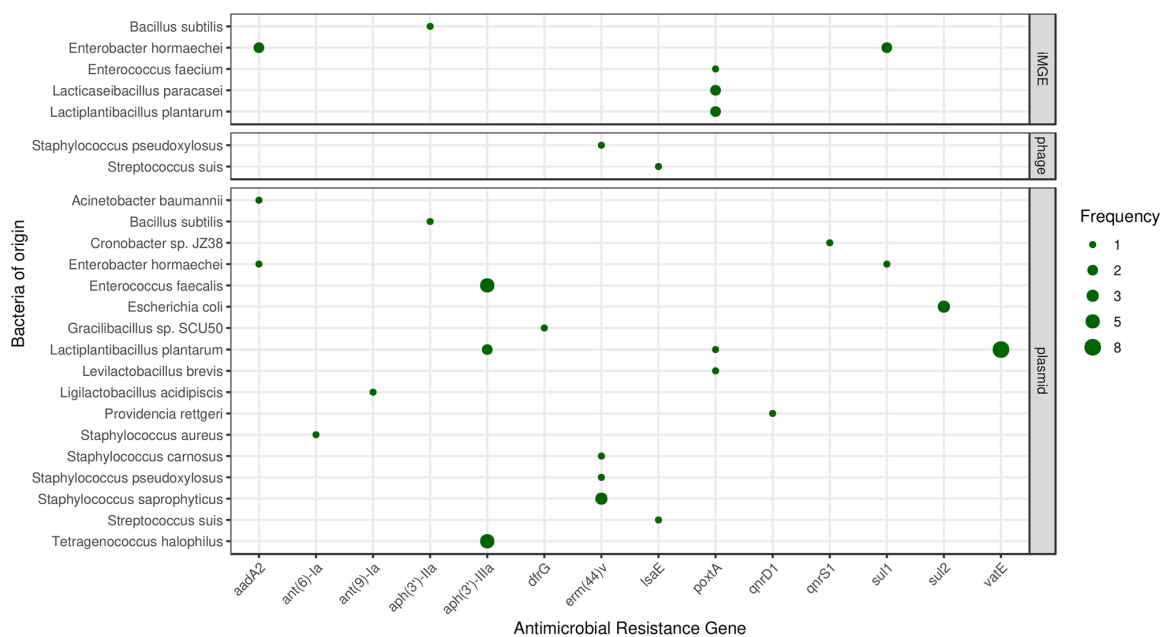


Figure 3. Mobile antimicrobial resistance gene frequency by bacteria of origin. The size of the dots indicates the occurrence frequency of the ARGs flanked by iMGE, positioned in a plasmid or a phage.

for this high ARG level. However, one possible cause might be that the PRJNA764355 samples were sequenced deeper and thus contained approximately 1.3 times more reads than the PRJNA495415 samples. It is known from previous studies that deeper sequencing leads to the generation of more complete genes by the de novo assembly^{5,7}.

In the following, our results will be interpreted from a perspective of bacteriological significance, genomic relevance and furthermore, antimicrobial stewardship and possible clinical aspects.

Taking the microbiome into consideration, bacteria that were predicted to harbor the identified ARGs can be classified according to their presence in silage. In the literature, the following bacteria are mentioned to be characteristic for silage: *B. subtilis*⁸, *E. faecium*⁹, *E. coli*¹⁰, *L. plantarum*¹¹, *L. lactis*¹², *L. brevis*^{13–15}, *L. acidipiscis*¹², *W. paramesenteroides*¹⁶. The genera of these species dominate the bacteriome of the samples. The identified *Cronobacter* sp. JZ38¹⁷ may be of plant origin. However, it can be assumed that other species may be present as contaminants of the silage: *A. amylophilus*, *E. hormaechei*, *E. faecalis*, *Gracilibacillus* sp. SCU50, *L. manihotivorans*, *L. paracasei*, *P. rettgeri*, *S. aureus*, *S. carnosus*, *S. pseudoxylosum*, *S. saprophyticum*, *S. suis*, *T. halophilus*. Nevertheless, some of these bacteria are members of the *Lactobacillaceae* family, the *Leuconostoc* or *Enterobacter* genera. Numerous species of these groups are typical for fermented food and feed components.

From a genomic point of view, the following was found in the literature regarding the co-occurrence of the ARGs identified in our study and the bacteria carrying them. *AadA2* encoding an aminoglycoside nucleotidyltransferase has been described in *A. baumannii* in former publications^{18,19}. *ant(6)-Ia*, that is an aminoglycoside nucleotidyltransferase gene, appears in many species, including *Lactobacillus* spp.²⁰. Its species-specific association with *A. amylophilus* has not been described in any former publications. *aph(3')-IIa*, an aminoglycoside phosphotransferase²¹, to our knowledge, has not been detected in *B. subtilis* up until now. *QnrS1* encoding a quinolone resistance protein was originally identified in *Shigella flexneri*²². In line with our results, this gene has recently been mentioned to appear in *Cronobacter* spp. in a case report²³. *E. hormaechei* deriving *aadA2* and *sul1*, a sulfonamide resistant dihydropteroate synthase gene that is described to appear in Gram-negative bacteria²¹ have been reported to appear in the genome of *Enterobacter* spp. and *E. hormaechei*, respectively in former publications as well^{24,25}. Within the *Enterococcus* genus, two perfect ARG matches were identified, namely *aph(3')-IIIa* in *E. faecalis* and *poxA* in *E. faecium*. *aph(3')-IIIa* is an aminoglycoside phosphotransferase that normally appears in *S. aureus*²¹ and *Enterococcus* spp.²⁶, while *poxA* is a gene encoding an ABC-F subfamily (ATP-binding cassette-F) protein that facilitates resistance to tetracycline, phenicol, and oxazolidinone via modification of the bacterial ribosome. First detection of *poxA* took place in a methicillin-resistant *S. aureus* strain²¹, followed by other bacterial species, including *E. faecium*²⁷. *Sul2*, a sulfonamide resistant dihydropteroate synthase of Gram-negative bacteria is commonly described in *E. coli*^{21,28}. *DfrG* is a plasmid-encoded dihydrofolate reductase²¹ that, to our knowledge, has not been described in *Gracilibacillus* spp. up until now, but has already appeared in the *Bacillaceae* family²⁹. *ant(6)-Ia*, an aminoglycoside nucleotidyltransferase gene appears in many species, including *Lactobacillus* spp.²⁰. Its species-specific association with *L. manihotivorans* has not been described in any publications. *PoxA* that was detected in *L. paracasei*, *L. plantarum* and *L. brevis* in the silage samples, has been described to appear in *Lactobacillaceae*, namely *L. acidophilus*, but not in these very species³⁰. Another

species that was detected harboring *aph(3')-IIIa* in the silage samples was *L. plantarum*. This finding is in line with the ARG-species match results mentioned in former publications³¹. Furthermore, *L. plantarum* was also associated with *vatE* that encodes an acetyltransferase conferring resistance against streptogramins²¹. *VatE* was originally found in *E. faecium*²¹ and has since then been identified in *Lactobacillaceae*³², but not specifically in *L. plantarum*. *L. acidipiscis ant(9)-Ia*, an aminoglycoside nucleotidyltransferase gene²¹ was associated with this genus for first within this study. Gene *qnrD1* encoding a quinolone resistance protein that is normally detected in *Salmonella enterica*²¹, has already been found in *Providencia* spp.³³ and was attached to *P. rettgeri* in our study as well. *S. aureus* could have been associated with two ARGs, *ant(6)-Ia* and *tetK* encoding a tetracycline efflux protein, that are both common findings in *Staphylococcus* spp.^{34,35}. Although, *erm(44)v* was first detected in the *S. saprophyticus*³⁶, no literature could be found about the appearance of this gene in *S. carnosus* or in *S. pseudoxylus* species. *IsaE* encoding another ABC-F subfamily protein conferring resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A is a common finding in *Streptococcus* spp.³⁷ and has also been associated with *S. suis* in previous publications³⁸. Besides the bacterial species mentioned above, *aph(3')-IIIa* was also detected in *T. halophilus*. This ARG is often appears in *Enterococcaceae*²¹ but has not yet been written down in this species. Furthermore, to our knowledge, *W. paramesenteroides* associated *ant(6)-Ia* has first been detected in this study.

Throughout our study, several ARGs were predicted to be co-occurring with genetic attributes facilitating mobility. The bioinformatic analysis of the mobility characteristics relied upon the identification of three major mobility determination groups, namely iMGEs, phages and plasmids. We found *aph(3')-IIa* linked to an integrated mobile genetic element in *B. subtilis* that is in line with similar findings of *E. coli*.²¹ While *aadA2* and *sul1* have both been described to appear on plasmids in *E. hormaechei*³⁹, we found them associated with iMGEs. Our finding on iMGE flanked *poxtA* in *E. faecium* is in line with the current literature⁴⁰. We found the same co-occurrence, namely *poxtA* and an iMGE, in *L. paracasei*. This phenomenon has not been published in that species to the best of our knowledge. Gene *erm(44)v* and *IsaE* were associated with prophages in *S. pseudoxylus* and *S. suis*. While a similar linkage can be found in the literature in connection with *erm(44)v*⁴¹, no details of mobility characteristics are mentioned in a recent report of the latter gene³⁸. All other mobile ARGs were detected on contigs that were predicted to derive from plasmids. In case of *aadA2* in *A. baumannii*²¹; *aadA2* and *sul1* in *E. hormaechei*²¹; *aph(3')-IIIa* in *E. faecalis*²¹; *sul2* in *E. coli*²¹; *aph(3')-IIIa* in *L. plantarum*⁴²; *qnrD1* in *P. rettgeri*²¹; *ant(6)-Ia* in *S. aureus*²¹ and *erm(44)v* in *S. saprophyticus*⁴¹ plasmid associations have been formerly described in the literature. To our knowledge, no publications have yet been released on the plasmid occurrence of *aph(3')-IIa* in *B. subtilis*, *dfrG* in *Gracilibacillus* sp. SCU50, *ant(9)-Ia* in *L. acidipiscis*, *IsaE* in *S. suis*, *qnrS1* in *Cronobacter* sp. JZ38, *erm(44)v* in *S. carnosus* and *S. pseudoxylus*. Hao et al. described *poxtA* embedded in a multi-resistance plasmid with mobile elements flanking in *E. fecalis*. This gene has been found in a number of Gram-positive bacteria, including enterococci as well, but it has neither been identified in *L. plantarum* nor *L. brevis*⁴³. Previous findings confirm the occurrence of *vat(E)* on plasmids⁴⁴. Nevertheless, in spite of its frequent presence in enterococci⁴⁵ there is no evidence of its former plasmid-associated appearance in *L. plantarum*. We found that gene *aph(3')-IIIa* of *T. halophilus* was encoded on a plasmid that is consistent with the fact that *aph(3')-IIIa* is often identified on high molecular weight plasmids and chromosomes of the enterococcal species⁴⁶. Nonetheless, to the best of our knowledge, a description of the *aph(3')-IIIa* gene in *T. halophilus* is a pioneer finding.

The mobility characteristics of the ARGs may not only provide us with information regarding the public health risk that may be associated with the samples, but also point to the possible origins of the genes. Regardless of human intervention, ARGs are present in the microbial communities⁴⁷. However, antimicrobial use and abuse intensifies the horizontal transfer of ARGs and thus contributes to the spread of AMR. In the animal production sector, the use of antibiotics is common, thus bacteria appearing in the feces and in the surroundings of the animals (e.g. in farm air, on tools, vehicles or other settings related to animals) often harbor bacteria with an advanced ARG set. Silage may get in direct physical contact with these bacteria at the farms and thus get contaminated with a few ARGs. Consequently, the presence of ARGs in the silage samples was well-expected, but the abundance of resistance genes and MGEs may increase due to the application of antibiotics.

Examining further aspects of antimicrobial stewardship and possible clinical relevance, phenotypical manifestations and public health considerations associated with the detected ARGs are both important. Intense antimicrobial use (AMU) can be associated with the headway of AMR, as antibiotic pressure selects for bacteria carrying ARGs that facilitate bacterial survival. Quantitatively, the majority of AMU around the globe occurs in agricultural settings^{48,49}. Intensive farming, that serves to fulfill the high global demand for animal proteins relies on an antibiotic infrastructure to treat and prevent disease and occasionally, to increase feed efficacy. In order to maximize economic gains, few countries still apply regulations that facilitate the use of low doses of antibiotics as growth promoters⁵⁰, while other regions, like the U.S. or Europe, have banned this practice. Nevertheless, besides the treatment of symptomatic infectious diseases, antibiotics are still widely used in the livestock sector for metaphylactic and prophylactic purposes in higher doses^{51,52}. Even though, compared to the poultry and pig production sector, average antibiotic usage has relatively lower rates by cattle⁵³, antimicrobial compounds are often chosen in this species as well. In cattle farming, mastitis is the most predominant reason for the administration of antibiotics by adult cattle, while enteritis and pneumonia is the most common reason for calves^{54,55}. According to various reports and studies from around the world^{54,56,57} tetracyclines are of inevitable significance in the medication of cattle, while beta-lactams, macrolides, sulfonamides, lincosamides and ionophore antibiotics are also very widely used. Of the European Medicines Agency (EMA) Highest-Priority Critically Important Antibiotics (HPCIA), namely third and fourth generation cephalosporines, fluoroquinolones and polymyxins, polymyxins and fluoroquinolones are the most applied, although their sales rates are still far below the most frequently administered antibiotic groups by livestock species⁵⁷. In our samples *E. faecium*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *S. aureus* and *S. suis* harbored genes, namely *poxtA* and *IsaE* that may confer resistance against multiple antibiotic groups, including tetracyclines. Moreover, *poxtA* was detected in the proximity of iMGEs in *L. paracasei* and *E. faecium* and harbored on a plasmid in *L. brevis*. In line with our findings, *Enterococcus* species related

to cattle were heavily associated with tetracycline resistance by other authors too⁵⁸. At some species *poxtA* and *lsaE* were even predicted to co-occur with more than one MGE type. In the genome of *L. plantarum* *poxtA* was predicted to be positioned on a plasmid and associated with an iMGE, while *S. suis* associated *lsaE* was located on a plasmid attached to a phage. Such genetic features may contribute to the horizontal transfer of ARGs among bacteria which is of outstanding clinical relevance in the case of such a commonly applied antibiotic group in cattle medicine, as tetracyclines. Perfect matches of genes conferring resistance against other clinically significant antibiotic groups, such as macrolides and sulfonamides were also identified in the genome of *E. hormaechei*, *E. faecium*, *E. coli*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. brevis*, *S. carnosus*, *S. pseudoxylus*, *S. saprophyticus* and *S. suis*. Of these genes, *lsaE*, *sul1*, *sul2* and *poxtA* were even predicted to have enhanced mobility due to their association with multiple MGE groups. The only perfect match for an ARG against HPCIA, *qnrS1*, that can confirm resistance against fluoroquinolones, has been detected in a *Cronobacter* spp. The presence of several ARGs presumably associated with iMGEs in the feed of dairy cows harbors the potential to affect the resident microbiota of the animals. As *B. subtilis* and *E. faecium* frequently appear in probiotics for cattle^{59,60} it is possible that some microorganisms colonize niches in the foregut and proliferate the ARGs they possess. However, even if they cannot reproduce in the ruminal environment, ARGs can still be disseminated through horizontal gene transfer, especially in the presence of antibiotic therapy. Furthermore, ARGs can possibly spread further, to lower gastrointestinal (GI) regions. Fecal microbiota transfer administered to the stomach could restore the microbial population of the colon in human patients⁶¹, indicating a high volume of viable bacteria reaching the distal regions. Similar results were found in cattle with rumen microbiota transplantation affecting the microbial population of the hindgut⁶². If ARGs spread all around the GI tract, serious animal and public health concerns could be raised. Among enteral diseases, salmonellosis is the major indication of antibiotic therapy in dairy cattle. Enhanced antibiotic resistance of these bacteria could contribute to the economic loss from the disease as many strains already exhibit resistance to several antibiotics⁶³. Furthermore, during pathological conditions, like ruminal acidosis, bacteria can translocate to distant locations in the host's body. Interestingly bacterial translocation was even described in the absence of GI diseases in case of specific microorganisms in humans and rodents^{64,65}.

As a consequence of the colonization and possible ARG proliferation processes, pathologies caused by phenotypically resistant bacteria can induce animal welfare and economic issues. Animals harboring ARGs in their gut can contaminate their environment with ARGs through fecal matter as well as farm workers who get in direct contact with the animals, even consumers of dairy products can be affected, as farm animal-borne bacteria that harbor potentially mobile ARGs^{66–68} might be distributed by products intended for human consumption. For instance, we have previously found ARGs in raw milk samples provided for human consumption⁶⁹. Fecal contamination during milking⁷⁰ is a possible way of ARG transfer into raw milk, however other routes are also possible. In humans and in rodents for instance, maternal mononuclear cells transfer microorganisms to milk during lactation^{66,67}. The possibility for this phenomenon was described in cattle as well⁶⁸.

ARGs that are transferred to the human body through these routes might decrease the efficacy of antibiotic therapy. In order to gain a deeper insight into the exact role of silage in possible ARG transmission processes, many points still need to be examined and clarified. It would be essential to analyse the colonization success of ARG harboring silage-borne bacteria that enter the body of animals and the extent of ARG transfer of invasive donor bacteria to recipient bacteria living in the gastrointestinal tract. The silage involved in the study is of *Medicago* origin, and our results are based on data from only two projects. Hence, it would also be necessary to investigate the ARG content of other alfalfa and corn silages.

Antimicrobial resistance is an emerging global threat to public health that both affects agriculture and the healthcare sector. The usage of antibiotics in livestock species exceeds the rate of human applications⁷¹. Antibiotic use in food animal medicine is also considered a risk as it may provide an indirect transfer route of antibiotic residual⁷² ARGs via the food chain⁷³. Even though antimicrobials administered for veterinary use, may exert an undesired effect on the food chain, the presence of ARGs in dairy cattle nutrition research is still under-represented in the literature. According to our results, microbial mass contained in fermented feeds have other medical risks than transmitting contagious diseases, like listeriosis⁷⁴. The bacterial content of these mass feeds, that is either, required for the fermentation processes or collected from various sources of contamination on the farms, could play an essential role in the ARG shift through the food chain.

Materials and methods

Data. We searched appropriate datasets in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) repository. In December 2021, only two shotgun metagenomic BioProjects (PRJNA495415⁷⁵, PRJNA764355) could have been found that had adequate depth for the de novo assembly that our study is based on. The median read count (interquartile range, IQR) of the samples was 26.5×10^6 (3.0×10^6) and 34.7×10^6 (1.5×10^6) in datasets PRJNA495415 and PRJNA764355, respectively. There is limited metadata available of the samples in the NCBI SRA database (Table 2). Nevertheless, it can be assumed from the metadata that the samples of PRJNA495415 were taken at different fermentation periods. Samples were taken on days 0, 7, 14 and 28 were classified in groups A, B, C and D, respectively. Based on metadata of PRJNA764355 samples, no such stratification was possible, so all samples were classified as group E.

Bioinformatic analysis. Quality based filtering and trimming of the raw short reads was performed with TrimGalore (v.0.6.6, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>), setting 20 as a quality threshold. Only reads longer than 50 bp were retained and taxonomically classified using Kraken2 (v2.1.1)⁷⁶ and a database created (24/03/2021) from the NCBI RefSeq complete archaeal, bacterial, viral and plant genomes. For this taxon assignment the -confidence 0.5 parameter was used to obtain more precise species level hits. The taxon classification data was managed in R⁷⁷ using functions of the packages phyloseq⁷⁸ and microbiome⁷⁹. The preprocessed reads

BioProject				PRJNA495415				PRJNA764355		
Group	A		B		C		D		E	
Id	Run	Id	Run	Id	Run	Id	Run	Id	Run	
1	SRR7990583	11	SRR7990582	21	SRR7990580	31	SRR7990581	41	SRR16036389	
2	SRR7990587	12	SRR7990586	22	SRR7990585	32	SRR7990584	42	SRR16036390	
3	SRR7990591	13	SRR7990590	23	SRR7990589	33	SRR7990588	43	SRR16036391	
4	SRR7990592	14	SRR7990593	24	SRR7990594	34	SRR7990595	44	SRR16036392	
5	SRR7990598	15	SRR7990599	25	SRR7990596	35	SRR7990597	45	SRR16036393	
6	SRR7990604	16	SRR7990605	26	SRR7990600	36	SRR7990601	46	SRR16036394	
7	SRR7990608	17	SRR7990609	27	SRR7990602	37	SRR7990603	47	SRR16036395	
8	SRR7990610	18	SRR7990611	28	SRR7990606	38	SRR7990607	48	SRR16036396	
9	SRR7990612	19	SRR7990613	29	SRR7990614	39	SRR7990615	49	SRR16036397	
10	SRR7990616	20	SRR7990617	30	SRR7990618	40	SRR7990619	50	SRR16036398	
								51	SRR16036399	
								52	SRR16036400	

Table 2. Analyzed samples. The samples of dataset PRJNA495415 were taken on days 0, 7, 14 and 28 were classified in groups A, B, C and D, respectively. All samples from BioProject PRJNA764355 are assigned to group E. Column Run contains the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) run identifiers.

were assembled to contigs with MEGAHIT (v1.2.9)⁸⁰ using default settings. The contigs were also classified taxonomically with Kraken2 with the same database as above. From the contigs all possible open reading frames (ORFs) were gathered with Prodigal (v2.6.3)⁸¹. The protein translated ORFs were aligned to the ARG sequences of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, v.3.1.3)^{21,82} by Resistance Gene Identifier (RGI, v5.2.0) with Diamond⁸³. ORFs having a perfect match against the CARD database were exclusively kept for further analysis. Integrative mobile genetic element (iMGE) content of contigs harboring ARG was analyzed with MobileElementFinder (v1.0.3) and its database (v1.0.2)⁶. Following the distance concept of Johansson et al.⁶ for each bacterial species, only those with a distance threshold defined within iMGEs and ARGs were considered associated. In the MobileElementFinder database (v1.0.2) for *E. hormaechei*, the longest composite transposon (cTn) was the *Tn3000*. In case of this species, its length (11,823 bp) was taken as the cut-off value. For *E. faecium*, this threshold was the length of the *Tn6246* transposon, namely 5,147 bp. As the database neither contains species-level, nor genus-level cTn data for *Bacillus*, *Lactiplantibacillus* and *Lactocaseibacillus* species, a general cut-off value was chosen for the contigs of these species. This value was declared as the median of the longest cTns per species in the database (10,098 bp). The plasmid origin probability of the contigs was estimated by PlasFlow (v.1.1)⁸⁴. The phage content of the assembled contigs was predicted by VirSorter2 (v2.2.3)⁸⁵. The findings were filtered for dsDNAphages and ssDNAs. All data management procedures, analyses and plots were performed in R environment (v4.1.0)⁷⁷.

Data availability

The datasets analysed in the current study are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) repository and can be accessed through the PRJNA495415 and PRJNA764355 BioProject identifiers.

Received: 24 December 2021; Accepted: 21 March 2022

Published online: 28 March 2022

References

- Eastridge, M. Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* **89**, 1311–1323 (2006).
- Driehuis, F., Spanjer, M., Scholten, J. & Te Giffel, M. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit. Contam. Part A*, **1**, 41–50 (2008).
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., De La Cruz, F. & Arechaga, I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 81–95 (2015).
- Goh, S. *Clostridium difficile: Methods and Protocols*, chap. Phage Transduction, 177–185 (Springer, 2016).
- Tóth, A. G. et al. A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt. *Sci. Rep.* **10**, 22458. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80444-5> (2020).
- Johansson, M. H. et al. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 101–109 (2021).
- Sims, D., Sudbery, I., Iott, N. E., Heger, A. & Ponting, C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 121–132 (2014).
- McAllister, T. et al. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J. Dairy Sci.* **101**, 4060–4074 (2018).
- Li, Y. & Nishino, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1561–1570 (2011).
- Ogunade, I. et al. Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. *J. Dairy Sci.* **101**, 2048–2059 (2018).

11. Zhao, S., Wang, Y., Yang, F., Wang, Y. & Zhang, H. Screening a *Lactobacillus plantarum* strain for good adaption in alfalfa ensiling and demonstrating its improvement of alfalfa silage quality. *J. Appl. Microbiol.* **129**, 233–242 (2020).
12. Khota, W., Pholsen, S., Higgs, D. & Cai, Y. Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. *J. Dairy Sci.* **99**, 9768–9781 (2016).
13. Xu, Z., He, H., Zhang, S. & Kong, J. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Sci. Rep.* **7**, 13614. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1> (2017).
14. Feyereisen, M. *et al.* Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species. *BMC Genom.* **20**, 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5783-1> (2019).
15. Paradhya, D. H. V. *et al.* Dual-purpose inoculants and their effects on corn silage. *Microorganisms* **8**, 765 (2020).
16. Björkroth, K. J. *et al.* Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 141–148 (2002).
17. Eida, A. A. *et al.* Genome insights of the plant-growth promoting bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatilediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00369> (2020).
18. Chen, J. *et al.* Prevalence and characterization of integrons in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in Eastern China: A multiple-hospital study. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* **12**, 10093–10105. <https://doi.org/10.3390/ijerph120810093> (2015).
19. Mak, J. K., Kim, M.-J., Pham, J., Tapsall, J. & White, P. A. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemoth.* **63**, 47–54 (2009).
20. Dec, M., Nowaczek, A., Stepień-Pysiński, D., Wawrzykowski, J. & Urban-Chmiel, R. Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiol.* **18**, 168. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1269-6> (2018).
21. Jia, B. *et al.* CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* **45**, D566–D573 (2017).
22. Hata, M. *et al.* Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005).
23. Lachowska, M., Izdebski, R., Urbanowicz, P., Zabicka, D. & Królak-Olejnik, B. Infection of *Cronobacter sakazakii* ST1 producing SHV-12 in a premature infant born from triplet pregnancy. *Microorganisms* **9**, 1878. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091878> (2021).
24. Du, N. *et al.* Transmission and characterization of bla_{NDM-1} in *Enterobacter cloacae* at a teaching hospital in Yunnan, China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **16**, 58. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0232-y> (2017).
25. Indugu, N., Sharma, L., Jackson, C. R. & Singh, P. Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from imported retail shrimp. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, e01103-e1120 (2020).
26. Woegerbauer, M., Kuffner, M., Domingues, S. & Nielsen, K. M. Involvement of aph(3)-IIa in the formation of mosaic aminoglycoside resistance genes in natural environments. *Front. Microbiol.* **6**, 442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00442> (2015).
27. Na, S.-H. *et al.* Detection of the phenicol-oxazolidinone resistance gene *poxA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from food-producing animals during 2008–2018 in Korea. *Microorganisms* **8**, 1839 (2021).
28. Hammerum, A. M. *et al.* Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 235–237 (2006).
29. Noor Uddin, G. M. *et al.* Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. *PLoS ONE* **10**, e0132338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132338> (2015).
30. Huang, Z. *et al.* Comparative genomics and specific functional characteristics analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *Microorganisms* **9**, 1992. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091992> (2021).
31. Rojo-Bezares, B. *et al.* Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 234–240 (2006).
32. Bischoff, K. M., Skinner-Nemec, K. A. & Leathers, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 739–744 (2007).
33. Mao, Y.-C., Chang, C.-L., Huang, Y.-C., Su, L.-H. & Lee, C.-T. Laboratory investigation of a suspected outbreak caused by *Providencia stuartii* with intermediate resistance to imipenem at a long-term care facility. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **51**, 214–219 (2018).
34. Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W. & Dowson, C. G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 763–770 (2000).
35. Hauschild, T. *et al.* Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Białystok, Poland. *Folia Histochem. Cytobiol.* **46**, 225–228 (2008).
36. Strauss, C., Hu, Y., Coates, A. & Perreten, V. A Novel erm(44) gene variant from a human *Staphylococcus saprophyticus* isolate confers resistance to macrolides and lincosamides but not streptogramins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01655-e1716 (2016).
37. Malbruny, B., Werno, A. M., Murdoch, D. R., Leclercq, R. & Cattoir, V. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the *lsa* (C) gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1470–1474 (2011).
38. Nicholson, T. L. *et al.* Comparative virulence and genomic analysis of *Streptococcus suis* Isolates. *Front. Microbiol.* **11**, 3563. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.620843> (2021).
39. Umeda, K. *et al.* Molecular characterization of bla_{KHM-1} encoding plasmid in an *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* isolate from blood culture. *PLoS ONE* **15**, e0227605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227605> (2020).
40. Lei, C.-W. *et al.* Clonal spread and horizontal transfer mediate dissemination of phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxA* in enterococci isolates from a swine farm in China. *Vet. Microbiol.* **262**, 109219 (2021).
41. Wendlandt, S. *et al.* Detection of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm* (44) and a novel *erm* variant in staphylococci from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, fiv090 (2015).
42. Zakaria, A. S., Kassem, M. A., El Far, M. S. & Edward, E. A. Characterization, in-vitro evaluation of probiotic potential and antagonistic activity of selected lactic acid bacteria strains isolated from natural origin against some human pathogens. *Bull. Pharm. Sci.* **44**, 225–241. <https://doi.org/10.21608/BFSA.2021.174149> (2021).
43. Hao, W. *et al.* Analysis of a *poxA*-and *optrA*-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 1771–1775 (2019).
44. Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J. & Woodford, N. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 433–436 (2000).
45. Cho, S., Barrett, J. B., Frye, J. G. & Jackson, C. R. Antimicrobial resistance gene detection and plasmid typing among multidrug resistant enterococci isolated from freshwater environment. *Microorganisms* **8**, 1338. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091338> (2020).
46. Jaimee, G. & Halami, P. Conjugal transfer of *aac*(6')*Ie*-*aph*(2'')*Ia* gene from native species and mechanism of regulation and cross resistance in *Enterococcus faecalis* MCC3063 by real time-PCR. *Microb. Pathog.* **110**, 546–553 (2017).
47. Martínez, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* **321**, 365–367 (2008).
48. Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E. & Larson, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Heal. Rep.* **127**, 4–22 (2012).

49. Van Boeckel, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science* **365**, eaaw1944 (2019).
50. Founou, L. L., Founou, R. C. & Essack, S. Y. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front. Microbiol.* **7**, 1881 (2016).
51. Baptiste, K. E. & Kyvsgaard, N. C. Do antimicrobial mass medications work? A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials investigating antimicrobial prophylaxis or metaphylaxis against naturally occurring bovine respiratory disease. *Pathog. Dis.* <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx083> (2017).
52. Word, A., Wickersham, T., Trubenbach, L., Mays, G. & Sawyer, J. Effects of metaphylaxis on production responses and total antimicrobial use in high-risk beef calves. *AAS* **36**, 265–270. <https://doi.org/10.15232/aas.2019-01914> (2020).
53. Van Boeckel, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS* **112**, 5649–5654 (2015).
54. Sawant, A., Sordillo, L. & Jayarao, B. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* **88**, 2991–2999 (2005).
55. Krömker, V. & Leimbach, S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 21–29. <https://doi.org/10.1111/rda.13032> (2017).
56. FDA. Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. *U.S. Department of Health and Human Services.* <https://www.fda.gov/media/154820/download> (2020).
57. EMA. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. *EMA/24309/2020.* <https://doi.org/10.2809/195073> (2020).
58. Zaheer, R. *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Sci. Rep.* **10**, 3937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5> (2020).
59. Kowalski, Z. *et al.* Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive. *J. Anim. Feed. Sci.* **18**, 399–411 (2009).
60. Mamuad, L. L. *et al.* Rumen fermentation and microbial community composition influenced by live *Enterococcus faecium* supplementation. *AMB Expr.* **9**, 123. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0848-8> (2019).
61. Cammarota, G., Ianiro, G. & Gasbarrini, A. Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: A systematic review. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 693–702 (2014).
62. Ji, S. *et al.* Ecological restoration of antibiotic-disturbed gastrointestinal microbiota in foregut and hindgut of cows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 79. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00079> (2018).
63. Smith, G. Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **31**, 47–60 (2015).
64. Rodriguez, A. V., Baigori, M. D., Alvarez, S., Castro, G. R. & Oliver, G. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 33–38 (2001).
65. Yelin, I. *et al.* Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nat. Med.* **25**, 1728–1732 (2019).
66. Perez, P. F. *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells?. *Pediatrics* **119**, e724–e732. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649> (2007).
67. Rodriguez, J. M. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation?. *Adv. Nutr.* **5**, 779–784 (2014).
68. Young, W., Hine, B. C., Wallace, O. A., Callaghan, M. & Bibiloni, R. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ* **3**, e888. <https://doi.org/10.7717/peerj.888> (2015).
69. Tóth, A. G. *et al.* Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. *Sci. Rep.* **10**, 7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4> (2020).
70. Oliver, S. P., Jayarao, B. M. & Almeida, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* **2**, 115–129 (2005).
71. Liu, J. *et al.* The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing. *Nat. Commun.* **10**, 4406. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12111-x> (2019).
72. Chen, J., Ying, G.-G. & Deng, W.-J. Antibiotic residues in food: Extraction, analysis, and human health concerns. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 7569–7586 (2019).
73. Pokharel, S., Shrestha, P. & Adhikari, B. Antimicrobial use in food animals and human health: Time to implement ‘One Health’ approach. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **9**, 181. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00847-x> (2020).
74. Raschle, S. *et al.* Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. *Sci. Rep.* **11**, 9066. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88514-y> (2021).
75. You, L. *et al.* Changes in chemical composition, structural and functional microbiome during Alfalfa (*Medicago sativa*) ensilage with *Lactobacillus plantarum* PS-8. *Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.12.004> (2022).
76. Wood, D. E., Lu, J. & Langmead, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* **20**, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0> (2019).
77. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2021).
78. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **8**, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217> (2013).
79. Lahti, L. & Shetty, S. microbiome R package (2012–2019).
80. Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T.-W. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* **31**, 1674–1676 (2015).
81. Hyatt, D. *et al.* Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinform.* **11**, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119> (2010).
82. McArthur, A. G. *et al.* The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3348–3357 (2013).
83. Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods.* **12**, 59–60 (2015).
84. Krawczyk, P. S., Lipinski, L. & Dziembowski, A. PlasFlow: Predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res.* **46**, e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321> (2018).
85. Guo, J. *et al.* VirSorter2: A multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* **9**, 37. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00990-y> (2021).

Acknowledgements

The authors would like to thank the providers of BioProject PRJNA495415 and PRJNA764355. The research was supported by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under Grant Agreement No. 874735 (VEO) and the Ministry of Innovation and Technology NRDI Office within the framework of the Artificial Intelligence National Laboratory Program MILAB. The authors are thankful to Oz Kilim in the manuscript editing.

Author contributions

N.S. takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. A.G.T., M.P., N.S. and S.Á.N. conceived the concept of the study. A.G.T., M.P., N.S. and S.Á.N. participated in the bioinformatic analysis. A.G.T., K.S., M.P., N.S. and S.Á.N. participated in the drafting of the manuscript. A.G.T., K.S., M.P., N.S. and S.Á.N. carried out the critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Veterinary Medicine.

Competing interests


The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

10.2. Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction



Article

Impact Evaluation of Score Classes and Annotation Regions in Deep Learning-Based Dairy Cow Body Condition Prediction

Sára Ágnes Nagy ¹, Oz Kilim ², István Csabai ², György Gábor ³ and Norbert Solymosi ^{1,2,*}

¹ Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078 Budapest, Hungary

² Department of Physics of Complex Systems, Eötvös Loránd University, 1117 Budapest, Hungary

³ Androvet Ltd., 1182 Budapest, Hungary

* Correspondence: solymosi.norbert@gmail.com; Tel.: +36-30-9347-069

Simple Summary: The body condition of dairy cattle is an essential indicator of the energy supply of the animals. Various scoring systems are used in practice to quantify body condition. These systems rely on visual observation of different body parts and sometimes on collecting tactile data. In all cases, scoring requires expert knowledge and practice and is time-consuming. Therefore, it is rarely carried out on livestock farms. However, for animal husbandry and veterinary practice, it would be meaningful to have data on the condition of the animals continuously or even daily, which is not feasible with expert scoring. We investigated how computer vision-based supervised deep learning, specifically neural networks, can automate body condition scoring. To execute this, we have used video recordings of the rumps of a large number of animals. We have trained and tested various convolutional neural networks with this collected data. Scoring by trained networks yielded results that met or exceeded the agreement among experts. We have made our trained neural networks freely available, using these as pretrained models. Those working on similar developments can achieve even better results with less data collection required with their own fine-tuning.

Abstract: Body condition scoring is a simple method to estimate the energy supply of dairy cattle. Our study aims to investigate the accuracy with which supervised machine learning, specifically a deep convolutional neural network (CNN), can be used to retrieve body condition score (BCS) classes estimated by an expert. We recorded images of animals' rumps in three large-scale farms using a simple action camera. The images were annotated with classes and three different-sized bounding boxes by an expert. A CNN pretrained model was fine-tuned on 12 and 3 BCS classes. Training in 12 classes with a 0 error range, the Cohen's kappa value yielded minimal agreement between the model predictions and ground truth. Allowing an error range of 0.25, we obtained minimum or weak agreement. With an error range of 0.5, we had strong or almost perfect agreement. The kappa values for the approach trained on three classes show that we can classify all animals into BCS categories with at least moderate agreement. Furthermore, CNNs trained on 3 BCS classes showed a remarkably higher proportion of strong agreement than those trained in 12 classes. The prediction precision when training with various annotation region sizes showed no meaningful differences. The weights of our trained CNNs are freely available, supporting similar works.

Keywords: deep learning; dairy cow; body score; prediction; accuracy



Citation: Nagy, S.Á.; Kilim, O.; Csabai, I.; Gábor, G.; Solymosi, N. Impact Evaluation of Score Classes and Annotation Regions in Deep Learning-Based Dairy Cow Body Condition Prediction. *Animals* **2023**, *13*, 194. <https://doi.org/10.3390/ani13020194>

Academic Editor: Andrea Pezzuolo

Received: 31 October 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 29 December 2022

Published: 4 January 2023



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

Body condition scoring of cattle is a widespread, noninvasive and easy-to-use but subjective and time-consuming method for estimating an animal's saturation of subcutaneous fat deposits [1,2]. The different scoring systems infer the animal's energy supply from the coverage of the lumbar, pelvic and tail head regions [2]. The accumulation of body stores is quantified using a numerical scale, where lean individuals have low values and overweight individuals have high values [3]. The saturation of fat and energy stores

can provide important guidance for farm management. Several studies have shown how a shift in body condition score (BCS) away from what is ideal is associated with changes in production [4]. Condition scores that are too high or low may indicate several health issues or mismanagement [4]. The association between a high condition score and the risk of ketosis is well known [4,5]. Furthermore, it is also associated with other metabolic problems (e.g., fatty liver) [6] or placenta retention [5]. Too low a condition score can be associated with lameness and reduced milk production [4]. Several pathological processes correlate with a decrease in BCS (e.g., metritis, inactive ovaries, displaced abomasum or more days open) [4]. Since pathological changes are often closely related to changes in BCS [4] rather than a specific condition score, it is understandable that continuous and reliable herd-level condition scoring would be an essential aid to dairy herd management [7–11]. This is hampered by the fact that scoring requires trained staff [2], and herd-level scoring is time-consuming. The volatility of intraobserver and interobserver agreements makes the BCS data generated challenging to use [12]. Mullis et al. [13] showed that the agreement between two experts' BCS values is moderate, while Song et al. [14] found that inter- and intraobserver agreement is weak and moderate, respectively.

Our study aims to investigate the accuracy with which supervised machine learning, specifically deep convolutional neural network (CNN)-based Detectron2 models, can be used to recover the BCS classes estimated by an expert using images of cows taken with a simple RGB camera. As a first approach, we investigate the quality of the predictions of the CNNs trained on our 12-level BCS scoring. In the following approach, we investigate the quality of the predictions of CNNs trained on three BCS classes corresponding to four different target intervals: T1 for calving (days in milk (DIM): 0) with dry period (DIM from -60 to -1) and dry off period (DIM > 300 and DIM < -60), T2 for early (DIM: 1–30) and mid-lactation (DIM: 101–200), T3 for peak lactation (DIM: 31–100) and T4 for late lactation (DIM: 201–300). Furthermore, we study how different region of interest (ROI) rectangles of the rump cause variation in the predictive power of our models.

2. Materials and Methods

2.1. Data Collection

Digital video recordings were taken over the course of 2 years with an SJCAM 4000 RGB camera at three large-scale dairy cattle farms in Hungary (farm F1: 1150 cows; F2: 880 cows; F3: 960 cows), with the camera positioned in the rotary milking parlor pointing at the animals' rumps. Not all of the milking cows were filmed in each video. To avoid overrepresentation of any cow with a given body scoring in the data set, we skipped at least a month between any two videos taken at a single site to ensure the conditions of the animals had changed.

2.2. Data Preprocessing

The recorded videos were annotated later by an expert remotely using the Visual Object Tagging Tool (VoTT, v2.2.0) [15], assigning both a bounding rectangle to the animal's rump as well as an estimated BCS. Scoring was performed in the range of 1–5. In this range, 12 levels were defined: 1–2.5 and 4–5 were divided into 0.5 score intervals, while 2.5–4.00 was divided more finely with 0.25 score intervals [2]. The scoring was performed continuously with movie footage, drawing the bounding boxes and making the BCS inference from only the image captured where the rump was at the closest point to the camera. These were the final images used to build the training, validation and test sets. After annotating the videos produced in the study, the same expert rechecked and adjusted the annotations with Label Studio [16]. The F1 and F2 farm images were split into the training and validation sets. This was performed with stratification of the BCS scores. By randomly selecting 80% of the images within each score level for the train set, we created the validation set with the remaining pictures. This ensured that the training and validation sets contained the same class distributions, thereby making the validation set loss an appropriate metric for model choice decisions. The annotated images from site

F3 were retained as an independent test set. The number of images per score in each set is summarized in Table 1. Three size bounding boxes were generated for each image automatically from the initial annotations (See Supplementary Material: Automated 3-box size annotation).

Table 1. The number of annotated images included in the study per score. Images from sites F1 and F2 were used to create the training and validation sets, while the held-out test set only consisted of images from the F3 site.

BCS	F1 & F2 Farm		F3 Farm
	Training	Validation	Test
1.00	162	41	22
1.50	215	54	31
2.00	363	91	53
2.50	370	93	65
2.75	182	46	42
3.00	323	81	41
3.25	381	95	50
3.50	659	165	66
3.75	74	18	9
4.00	58	14	11
4.50	46	12	6
5.00	89	22	11
Total:	2922	732	407

2.3. Choice of Model Architecture

Body scoring is an object detection and classification problem. For this reason, we chose an object detection model that could leverage both bounding box and class ground truth annotations. The Faster R-CNN architecture [17] has a shared model internal representation for the joint localization and classification prediction tasks. This joint learning task is apparent by inspecting the form of the loss function used for training $\ell = \ell_{cls} + \ell_{bbox}$. Due to the state-of-the-art results, the Detectron2 [18] implementation of the Faster R-CNN architecture was chosen. All models were downloaded from the Model Zoo code repository with network parameters pretrained on the COCO Dataset.

2.4. Evaluation Metrics

The performance of our model's localization could be reviewed in terms of the bounding box prediction average precision at IoU = 0.50 (AP50). This value increases when the predicted bounding boxes overlap more with the ground truth annotation bounding boxes. In addition to detecting an object in the image, Detectron2 estimates a class probability distribution over all classes. As the final classification, it assigns the object to the class for which the probability is the highest among all possible classes. The quality of the predictions was quantified using Cohen's kappa [19] and accuracy. Kappa is defined as $kappa = (P_0 - P_e) / (1 - P_e)$, where P_0 is the observed agreement between the ground truth and predicted classes and P_e is the probability change agreement between the model prediction and annotation ground truth. Cohen's kappa values can be interpreted as follows: 0–0.20 = no, 0.21–0.39 = minimal, 0.40–0.59 = weak, 0.60–0.79 = moderate, 0.80–0.90 = strong and above 0.90 = almost perfect agreement [20]. Following the “one-versus-all” scheme, the accuracy was calculated by comparing each class to the remaining levels with the formula $accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$, and from these results, the overall accuracy was reported as the mean.

2.5. Model Screening

To pre-screen for the most appropriate pretrained model for the BCS task, 10 pretrained models of Detectron2 [18] were further trained and validated on our data sets, each with

identical hyperparameters for 15 epochs. In this model selection phase, the raw BCS scores were classified into three classes (BCS classes: <2.5, between 2.5 and 3.75 and >3.75). The R_50_FPN_3x model gave the lowest validation loss, so we selected and used this pretrained model in all further experiments (Table 2).

Table 2. Model selection. Ten pre-trained models of Detectron2 were run on the same data set with the same settings (number of epochs: 15). The model with the lowest validation loss was chosen for all further experiments.

Pretrained Faster R-CNN Model	Validation Loss
R_50_FPN_3x	0.0612
R_101_FPN_3x	0.0628
R_50_FPN_1x	0.0637
X_101_32x8d_FPN_3x	0.0662
R_50_DC5_1x	0.0796
R_50_DC5_3x	0.0840
R_101_C4_3x	0.0848
R_101_DC5_3x	0.0848
R_50_C4_1x	0.1019
R_50_C4_3x	0.1040

2.6. Model Training and Prediction

2.6.1. With 12 BCS Classes

Using the selected pretrained model, the first experiment was run by training, validating and testing of the 12-level ordinal scoring annotations. This was repeated for each of the three bounding box sizes (see Figure 1) separately. Using the model's optimal weights at checkpoints with the lowest validation losses and AP50s, we made predictions for the validation and test sets. The class where the probability distribution (output by the model) had its maximum was taken as the estimated body score. We also kept the "predicted class probabilities", as they are a measure of model confidence for a given prediction.

Following the approach of Yukun et al. (2019) [21], we evaluated the model predictions with 0, 0.25 and 0.5 error thresholds to account for the ordinal nature of the body condition scores and thereby allowed "near miss" predictions to be defined as correct, reducing metric stringency.

2.6.2. With Three BCS Classes for Four Practical Target Intervals

In addition to the 12-point BCS annotation, we also assessed the quality of the predictions according to more broad BCS classes of practical relevance. Different BCS ranges are considered optimal at different stages of lactation. These target intervals are summarized in Table 3. We relabeled all the original BCSs according to four different threshold regime (T1, T2, T3 and T4) target ranges: T1, the optimal target interval for calving (days in milk (DIM): 0) and the dry period (DIM from -60 to -1) and dry off period (DIM > 300 and DIM: < -60); T2 for early (DIM: 1-30) and mid-lactation (DIM: 101-200); T3 for peak lactation (DIM: 31-100) and T4 for late lactation (DIM: 201-300). We created three new BCS classes for each type of thresholding: below the target interval, the target interval and above the target interval. The training, validating and testing sessions were re-run with these three new classes for each of the four thresholding regimes and for each of the three bounding box sizes. Each experiment used the same input images, where the label definitions varied between each. In Table 3, the linked figure shows the proportion of images after reclassification in the training, validation and test sets. The proportion of classes was the same in the training and validation set (farm F1 and F2) and the test (farm F3) set. This allowed for fair testing, as the class imbalance was the same in training and validation and test sets.

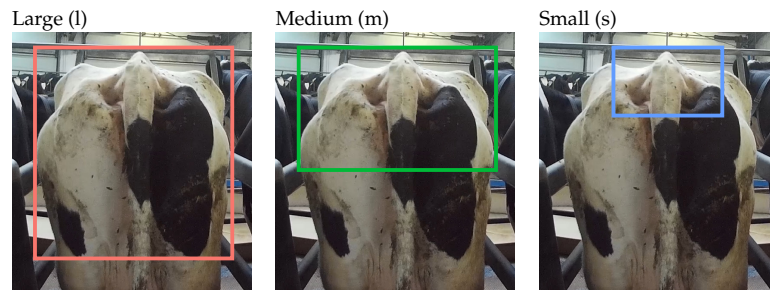
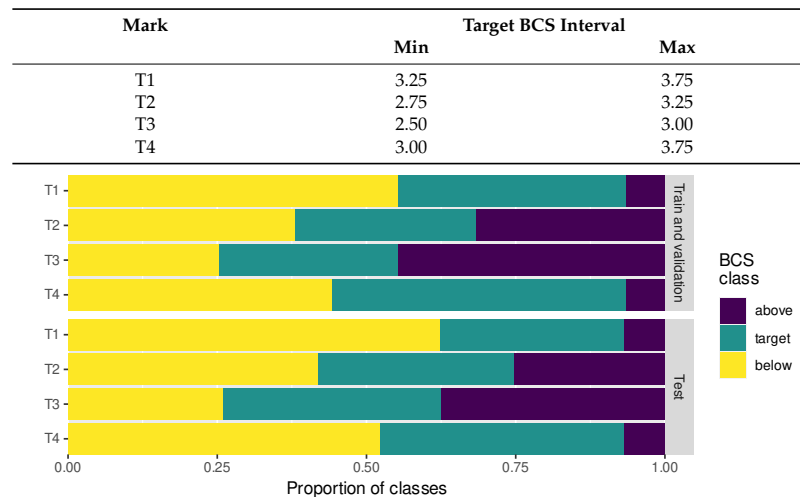


Figure 1. Annotation rectangles. The large (l) box was placed across the width of the two *tuber coxae* from the *anterior coccygeal vertebrae* (tail head) to mid-thigh. The medium (m) box was the entire width between the *coxal tuberosities* from the tail head to the *symphysis pelvis*. The small (s) box only framed the *ischial tuberosities* and the tail head, containing the depression between the *tuber ischii* and the *anterior coccygeal vertebrae*, and the area between the *tuber coxae* and the *sacral spinous processes*.

To compare the training process between training on 3 classes and training on 12 classes, we repeated the analysis in a way where 12 classes were predicted, but they were then reclassified to the new 3 classes at the inference time (see Figure S1).

Table 3. Body condition score target intervals: T1 for calving (DIM: 0) and the dry period (DIM from −60 to −1), and the dry off period (DIM > 300 and DIM < −60); T2 for early (DIM: 1–30) and mid-lactation (DIM: 101–200), T3 for peak lactation (DIM: 31–100) and T4 for late lactation (DIM: 201–300). Below, the relabeling for each interval is shown. For each regime, the original ordinal labels were relabeled according to the given threshold of that regime. For example, with the T1 thresholding, there were more images with cows in the “below” class, whereas if we relabeled the data with the T2 thresholding, then the three classes were more evenly split. Class distributions in the training and validation sets match respective test sets.



3. Results

3.1. Prediction with 12 BCS Classes

The quality of the predictions for the 12 classes, based on the training with 12 classes, is shown in Figure 2. The *x* axis represents the results thresholded by predicted class probabilities. As the threshold increased, only images classified with high model confidence were used to calculate kappa and the accuracy. Traversing the *x* axis of each plot gives an idea of how the data clustered near the learned decision boundary in high dimensional space. Images near the decision boundary had a low predicted class probability (model confidence). Images with high confidence were to be classified better.

When training and evaluating in 12 classes and allowing for an error range of 0, the kappa value on the test set yielded minimal agreement but worse agreement above a class prediction probability of about 75%. For the validation set, the agreement was similar to below 75% class prediction probability. In contrast, above this level, the agreement was weak for the l and s boxes and even weaker than the minimum for the m box. If we allowed an error range of 0.25, then we obtained minimum agreement below the 50% class prediction probability on both the test and the validation set, and above that, the maps fell into the weak agreement range. When allowing an error range of 0.5, we had curves running above or close to the strong cut point with a class prediction probability of about 60% on both the test and validation sets. However, from 65% to 70%, we found almost perfect agreement.

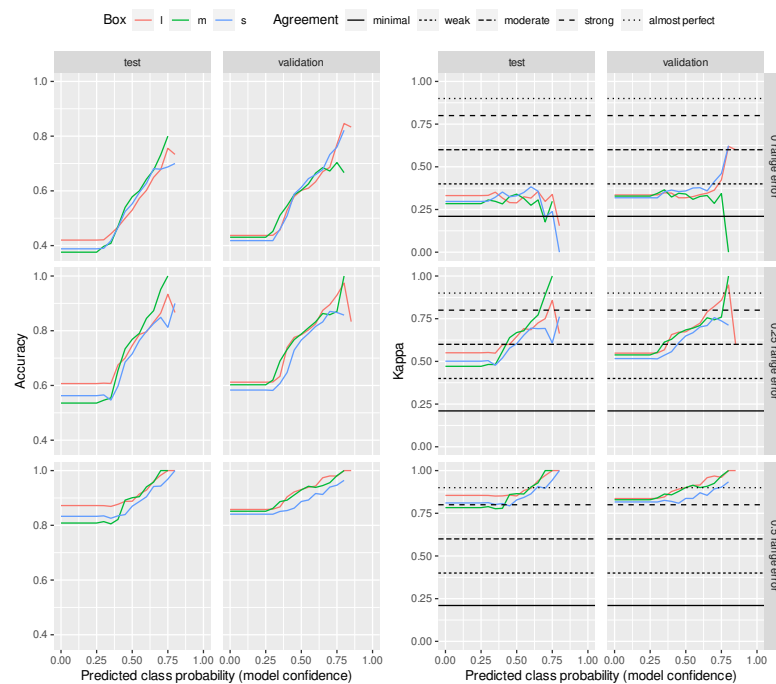


Figure 2. Model trained and evaluated with 12 BCS classes. Prediction confidence values (accuracy and Cohen’s kappa) were estimated on test and validation sets as a function of predicted class probability. Three error ranges (0, 0.25 and 0.5) were allowed for agreement analysis of the expert-given and predicted scores. The horizontal lines represent the thresholds of McHugh [20] to interpret Cohen’s kappa values.

3.2. Prediction with Three BCS Classes

Figure 3 shows the quality of the predictions made on only 3 BCS classes instead of 12 BCS classes. The three classes were created according to the four target ranges (T1–T4) presented in Table 3. The expert's scores assigned to the images were reassigned to one of the three BCS classes and then used to perform the training, with the prediction also being made for three classes. In this three-class regime, the network made high-quality predictions. This type of classifier may be more relevant for farms to give lower-resolution but reliable predictions and act more as a screening tool. If animals are predicted to be out of the target, then they can be further investigated.

In a second “control” approach, we trained the network on 12 BCS classes and returned 12 classes with the predictors as in Figure 2. We then reclassified the 12 classes into the 3 BCS classes. This was also repeated for each T1–4 regime. These results can be seen in Figure S1. The traversal of model confidence thresholding showed more noise. This is understandable, as the body scoring classes are ordinal but not continuous [14]. To further compare the two approaches, we examined the difference in the kappa and accuracy values for the joint class classification probabilities. For this, we subtracted the values of the trained set on 12 classes from the values of the trained set on 3 classes. In Figure S2a, the mean and the standard deviation of the differences are plotted as outlined in the Supplementary Materials. The methods showed similar performances.

The differences between the prediction goodness of annotation boxes obtained from the networks taught by the three classes are summarized in Figure S2b. We may observe the same trends for accuracy and kappa for all target ranges in the box prediction differences. It can also be seen that the differences between the boxes were an order of magnitude smaller than those obtained from the networks taught by classes of 12 and 3. Based on the test set, the prediction precision per box in descending order for the target ranges was as follows: T1: m, s, l; T2: s, m, l; T3: l, s, m; T4: m, l, s. In the validation set, the prediction precision per box in descending order for the target ranges was as follows: T1: m, l, s; T2: m, l, s; T3: s, l, m; T4: m, l, s.

As we traversed the x axis for each result, we had fewer and fewer predicted images to evaluate the metric. Figure 4 summarizes the proportion of the initial (test or validation) data set corresponding to each predicted class probability value. For the neural networks trained on 12 classes, at a predicted class probability value of 40%, half of the images were already dropped. However, for the networks taught by 3 classes, even at the highest predicted class probability value, half of the images or slightly less than half of the images were still part of the analysis. The three-class classification could be considered more of an “easy” task for the network, so higher model confidence for the predicted classes was reasonable. We found variation between the results of the three box sizes to not be very large, indicating that the supervised signal was mainly found within the medium box area.

Regardless of the target range (T1–T4), the kappa values of the approach trained and evaluated in the three classes showed that we could classify all animals into BCS categories with at least moderate agreement. Figure 5 shows the proportion of predictions based on training for different target ranges with different box sizes that resulted in at least strong agreement.

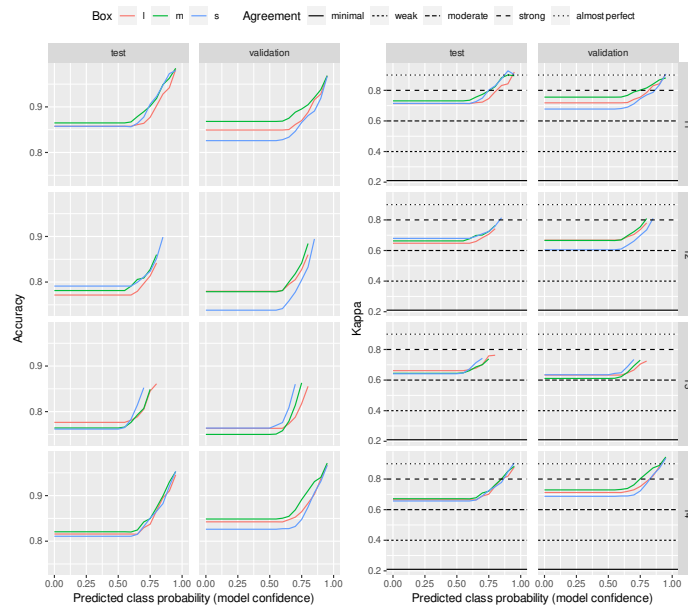


Figure 3. Model trained and evaluated with three BCS classes. Prediction confidence values (accuracy and Cohen’s kappa) were estimated on test and validation sets as a function of predicted class probability. The horizontal lines represent the thresholds of McHugh [20] to interpret Cohen’s kappa values.

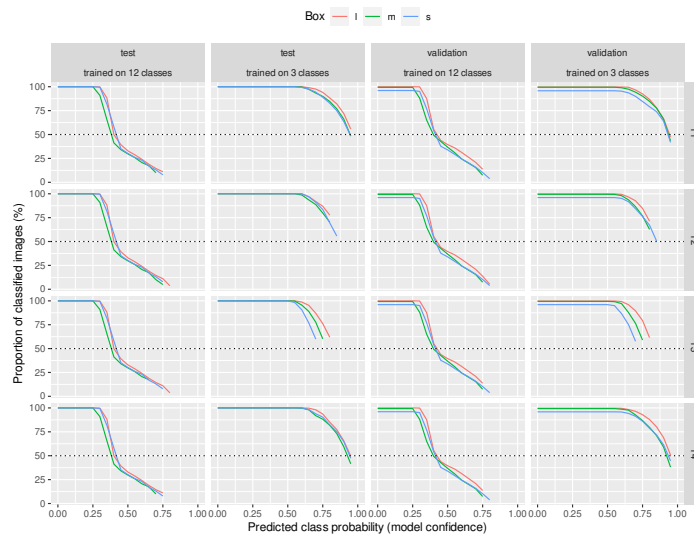


Figure 4. Proportion of classified images. As the threshold cutoff is more stringent, the number of images left gets smaller. The reduction occurred to a larger extent for the 12 class experiments. This gives an insight into the distribution of images concerning the learned decision boundary in the model representation.

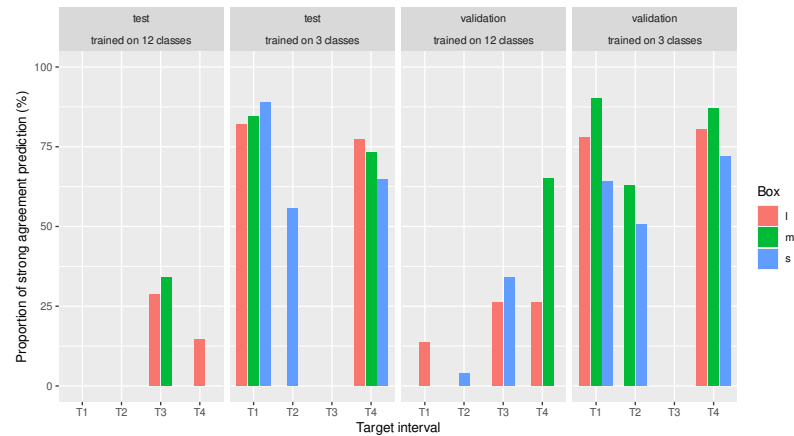


Figure 5. Proportion of predictions with strong agreement (Cohen’s kappa ≥ 0.8). For predictions over different target ranges (T1–T4). CNNs trained in three BCS classes showed a remarkably higher proportion of strong agreement than those trained in 12 classes and then reclassified.

4. Discussion

Several possible approaches to estimating cattle body conditions using neural networks exist [21–23]. The more common approach in the literature is to use recordings of animals scored with high-resolution scoring, such as in 0.25 or 0.5 unit increments, to train the neural network and to test how the trained network performs in terms of prediction reliability at the same scale. Assume no discrepancy is allowed between the observed and predicted scores. In that case, these approaches yield weak agreement, as indicated by the $kappa = 0.45$ value of Yukun et al. [21]. If we allowed some variation between the observed and predicted scores, both the kappa and accuracy values improved. As the first step in our investigation, we followed the approach, and similar results were obtained around the reliability values presented by other authors [21,22,24–28].

However, in addition to these high-resolution score classes, we felt it was worthwhile to investigate the prediction quality that could be achieved for practically important condition score classes. We conducted this investigation in two forms. In one, we trained a neural network on the high-resolution, detailed 12-point level data set, and then both the predictions and original expert scores were classified into three condition categories. Thus, there were a target range category (T1, T2, T3 and T4) and categories below and above the target range. In the second approach, we trained the neural network with the data set already divided into three categories and made predictions corresponding to the three classes. The test and validation set’s predictions showed that the latter approach gave better results with lower noise. However, after splitting into three categories, the networks trained on the 12 categories also gave good results, but these results were noisier and could be evaluated to be a less robust approach.

We also considered the probability that the neural network assigned a BCS class to the object detected in each image. The kappa and accuracy values presented were evaluated as a function of this class assignment probability. It can be seen that the precision of the predictions improved with an increasing class assignment probability. Nevertheless, as the class ranking probability increased, fewer images could be considered in evaluating the reliability of the predictions. When comparing the networks trained on 12 classes and 3 classes, it can be seen that the class assignment probabilities were lower for the former than for the latter. For this reason, as we increased the threshold of the classification probability of the images included in the prediction precision analysis, the number of usable images predicted by the neural network trained on the 12 classes decreased rapidly, while for the

networks trained on 3 classes, the number of usable images decreased much more slowly as the classification probability threshold increased. Even at the highest threshold, roughly half of the images were retained. This approach has not been found in the literature, where the prediction precision was analyzed in conjunction with the classification probability. However, the results show that it significantly affects the prediction quality and thus the practical efficacy of body condition prediction based on neural networks. Nevertheless, it is still problematic that the number of images with a higher classification probability was less than the number of animals in the set used for prediction. The results show that at the most reliable classification probability threshold, we lost half of the animals, which means we obtained reliable conditioning information for half of the animals on a given day. However, we aim to obtain daily information on all individuals in a given herd. We see several possibilities to address this problem, which further studies could clarify. One approach could be based on the fact that animals are snapped not only once but several times during milking in the carousel systems. We could identify the highest probability class from their class distribution if we predicted each of these. Nevertheless, we can conclude from Figure 5 that the prediction of CNNs trained in class 3 showed a significant proportion of strong agreement which was better than the inter-rater agreement found in the literature.

The use of practical thresholds in the 3-grade approach trained in 12 classes and assessed in 3 classes is problematic. Several authors showed that high prediction reliability can be obtained in error ranges of 0.25 or 0.5 [21,22,24–28]. However, when we tried to assign this to the practical condition categories we used, it was impossible for many to decide which practical condition interval to place an animal in with an error range of 0.25 or 0.5. It is important to emphasize that our study aimed to investigate the reliability with which a neural network can reproduce the scores and score categories of animals scored by an expert. It is also possible to construct a ground of truth from the scores of several experts rather than one. However, it is worth considering that the agreement between the scores of two independent experts is weak or moderate based on the literature. The results reported by Mullis et al. [13] show that Cohen's kappa of the agreement between two experts' BCS values is 0.62 and 0.66, while Song et al. [14] found that an inter-assessor agreement kappa = 0.48, while the intra-assessor agreement kappa is 0.52 and 0.72. Thus, the prediction precision of a neural network built on this basis could easily be worse, not better.

In our study, we used a test set from an independent site in addition to the validation set to see the robustness of the neural network prediction. After all, it was expected that if animals from the same farm were given the training and validation sets, the prediction for the validation set would be better than the predictions for an utterly independent farm. Surprisingly, the predictions of the networks trained on the three classes differed little for the test and validation sets. A further interesting feature of our results is that the prediction precision based on the three types of annotation boxes (large, medium and small) also differed very little. We chose three different-sized annotation boxes because we might have thought a large box contained more information than the algorithm could capture. Conversely, it seems that a medium-sized box contained the most usable information, which still had little noise. Next in line was the small box, which gave slightly better results than the large box. Here, we can think of it as containing less information and less noise. In contrast, the big one had more noise with more information. Thus, the order was that the middle one came after the small box, followed by the large box in terms of prediction performance.

In our work, we deliberately did not use complementary tactile examinations in the generation of expert scores because when teaching a neural network based purely on images, this information is not available to the algorithm, so the expert's information in scoring is richer than what we can offer the neural network.

The results show that the quality of training and prediction from two-dimensional images taken with a simple sports camera using Detectron2 is not inferior to the prediction

results based on three-dimensional cameras or on scoring with tactile detection [29,30]. An additional option to consider to improve the prediction quality could be to use ensemble prediction of different trained networks as the final output.

The results for the weights generated for the CNNs are publicly available. Others can use this as a pretrained model for training neural networks on similar images. Thus, presumably, they can create their neural networks while using fewer images to predict BCS categories. The presented results suggest that similar outcomes can be expected in condition scoring for other breeds and types of utilization. However, this assumes that similar CNNs should be trained on data sets generated by a scoring system applied to given breeds and types of utilization. Thus, the trained algorithm presented here cannot be used one-to-one for other breeds and utilization types.

5. Conclusions

Our results conclude that CNN training on classes corresponding to practically relevant target ranges gives more robust and precise predictions than training on high-resolution classes. With predictions based on target interval training, we obtained similar or even better results than the agreement between experts. The prediction precision based on training with various annotation regions showed no meaningful differences.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13020194/s1>, Figures S1 and S2. Automated 3 box size annotation, 12 class training and testing after re-labeling test sets into T1-4 classes.

Author Contributions: N.S. takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. N.S., S.Á.N. and G.G. conceived the concept of the study. S.Á.N. performed the data annotation. N.S. and S.Á.N. participated in the model training, predictions and statistical analysis. N.S., S.Á.N. and O.K. participated in the drafting of the manuscript. N.S., S.Á.N., O.K., I.C. and G.G. carried out the critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This study was supported by European Union project RRF-2.3.1-21-2022-00004 within the framework of the MILAB Artificial Intelligence National Laboratory.

Institutional Review Board Statement: At no point in the study did the data collection affect the welfare of the cows, as the video recordings had no effect on the animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The weights used for the predictions from training with each BCS class and annotation box combination can be downloaded from <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21372000.v1> (accessed on 3 January 2023).

Acknowledgments: We thank Alex Olár for his suggestions to help us in our work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the study design; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Edmonson, A.; Lean, I.; Weaver, L.; Farver, T.; Webster, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* **1989**, *72*, 68–78. [[CrossRef](#)]
2. Ferguson, J.D.; Galligan, D.T.; Thomsen, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **1994**, *77*, 2695–2703. [[CrossRef](#)]
3. Roche, J.; Dillon, P.; Stockdale, C.; Baumgard, L.; VanBaale, M. Relationships among international body condition scoring systems. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 3076–3079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bewley, J.; Schutz, M. An interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle. *Prof. Anim. Sci.* **2008**, *24*, 507–529. [[CrossRef](#)]
5. Morrow, D.A. Fat cow syndrome. *J. Dairy Sci.* **1976**, *59*, 1625–1629. [[CrossRef](#)]
6. Roche, J.R.; Kay, J.K.; Friggens, N.C.; Loor, J.J.; Berry, D.P. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **2013**, *29*, 323–336. [[CrossRef](#)]

7. Silva, S.R.; Araujo, J.P.; Guedes, C.; Silva, F.; Almeida, M.; Cerqueira, J.L. Precision technologies to address dairy cattle welfare: Focus on lameness, mastitis and body condition. *Animals* **2021**, *11*, 2253. [CrossRef] [PubMed]
8. Alborno, R.I.; Giri, K.; Hannah, M.C.; Wales, W.J. An improved approach to automated measurement of body condition score in dairy cows using a three-dimensional camera system. *Animals* **2022**, *12*, 72. [CrossRef] [PubMed]
9. Tao, Y.; Li, F.; Sun, Y. Development and implementation of a training dataset to ensure clear boundary value of body condition score classification of dairy cows in automatic system. *Livest. Sci.* **2022**, *259*, 104901. [CrossRef]
10. Truman, C.M.; Campler, M.R.; Costa, J.H. Body condition score change throughout lactation utilizing an automated BCS system: A descriptive study. *Animals* **2022**, *12*, 601. [CrossRef]
11. Zhao, K.; Zhang, M.; Shen, W.; Liu, X.; Ji, J.; Dai, B.; Zhang, R. Automatic body condition scoring for dairy cows based on efficient net and convex hull features of point clouds. *Comput. Electron. Agric.* **2023**, *205*, 107588. [CrossRef]
12. Kristensen, E.; Dueholm, L.; Vink, D.; Andersen, J.; Jakobsen, E.; Illum-Nielsen, S.; Petersen, F.; Enevoldsen, C. Within-and across-person uniformity of body condition scoring in Danish Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 3721–3728. [CrossRef] [PubMed]
13. Mullins, I.L.; Truman, C.M.; Campler, M.R.; Bewley, J.M.; Costa, J.H. Validation of a commercial automated body condition scoring system on a commercial dairy farm. *Animals* **2019**, *9*, 287. [CrossRef] [PubMed]
14. Song, X.; Bokkers, E.; Van Mourik, S.; Koerkamp, P.G.; Van Der Tol, P. Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 4294–4308. [CrossRef] [PubMed]
15. Visual Object Tagging Tool (VoTT). 2020 Available online: <https://github.com/microsoft/VoTT> (accessed on 3 January 2023).
16. Tkachenko, M.; Malyuk, M.; Holmanyuk, A.; Liubimov, N. Label Studio: Data labeling software, 2020–2022. Open source software. Available online: <https://github.com/heartexlabs/label-studio> (accessed on 3 January 2023).
17. Ren, S.; He, K.; Girshick, R.; Sun, J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. In Proceedings of the 28th International Conference on Neural Information Processing Systems—Volume 1, Montreal, QC, Canada, 7–12 December 2015; MIT Press: Cambridge, MA, USA, 2015; NIPS'15, pp. 91–99.
18. Yuxin Wu and Alexander Kirillov and Francisco Massa and Wan-Yen Lo and Ross Girshick. Detectron2. 2019. Available online: <https://github.com/facebookresearch/detectron2> (accessed on 3 January 2023).
19. Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* **1960**, *20*, 37–46. [CrossRef]
20. McHugh, M.L. Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochem. Medica* **2012**, *22*, 276–282. [CrossRef]
21. Yukun, S.; Pengju, H.; Yujie, W.; Ziqi, C.; Yang, L.; Baisheng, D.; Runze, L.; Yonggen, Z. Automatic monitoring system for individual dairy cows based on a deep learning framework that provides identification via body parts and estimation of body condition score. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 10140–10151. [CrossRef]
22. Alvarez, J.R.; Arroqui, M.; Mangudo, P.; Toloza, J.; Jatip, D.; Rodríguez, J.M.; Teyseyre, A.; Sanz, C.; Zunino, A.; Machado, C.; et al. Body condition estimation on cows from depth images using Convolutional Neural Networks. *Comput. Electron. Agric.* **2018**, *155*, 12–22. [CrossRef]
23. Çevik, K.K. Deep Learning Based Real-Time Body Condition Score Classification System. *IEEE Access* **2020**, *8*, 213950–213957. [CrossRef]
24. Krukowski, M. *Automatic Determination of Body Condition Score of Dairy Cows from 3D Images*; Skolan för datavetenskap och kommunikation; Kungliga Tekniska Högskolan: Stockholm, Sweden, 2009.
25. Bercovich, A.; Edan, Y.; Alchanatis, V.; Moallem, U.; Parmet, Y.; Honig, H.; Maltz, E.; Antler, A.; Halachmi, I. Development of an automatic cow body condition scoring using body shape signature and Fourier descriptors. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 8047–8059. [CrossRef]
26. Anglart, D. *Automatic Estimation of Body Weight and Body Condition Score in Dairy Cows Using 3D Imaging Technique*; SLU, Department of Animal Nutrition and Management: Uppsala, Sweden, 2014.
27. Shelley, A.N. *Incorporating Machine Vision in Precision Dairy Farming Technologies*; University of Kentucky: Lexington, KY, USA, 2016.
28. Spoliansky, R.; Edan, Y.; Parmet, Y.; Halachmi, I. Development of automatic body condition scoring using a low-cost 3-dimensional Kinect camera. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 7714–7725. [CrossRef] [PubMed]
29. Shigetani, M.; Ike, R.; Takemura, H.; Ohwada, H. Automatic measurement and determination of body condition score of cows based on 3D images using CNN. *J. Robot. Mechatronics* **2018**, *30*, 206–213. [CrossRef]
30. Yu, J.; Yang, B.; Wang, J.; Leader, J.K.; Wilson, D.O.; Pu, J. 2D CNN versus 3D CNN for false-positive reduction in lung cancer screening. *J. Med. Imaging* **2020**, *7*, 051202. [CrossRef] [PubMed]

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.

10.3. Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,
or referenced by the media as validated information.

Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction

Sára Ágnes Nagy

Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078 Budapest, Hungary

<https://orcid.org/0000-0003-0411-5887>

István Csabai

Department of Physics of Complex Systems, Eötvös Loránd University, 1117 Budapest, Hungary

<https://orcid.org/0000-0001-9232-9898>

Tamás Varga

SZIMBIÓVET Ltd., 9783 Egyházasköd, Hungary

Bettina Póth-Szebenyi

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, 7400 Kaposvár, Hungary

György Gábor

Androvet Ltd., 1182 Budapest, Hungary

Norbert Solymosi (✉ solymosi.norbert@gmail.com)

Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078 Budapest, Hungary

<https://orcid.org/0000-0003-1783-2041>

Research Article

Keywords: Sub-clinical mastitis, artificial neural network, positive predictive value

Posted Date: April 27th, 2023

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2865554/v1>

License: © ⓘ This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

[Read Full License](#)

Neural network-aided milk somatic cell count gain prediction

Sára Ágnes Nagy¹, István Csabai², Tamás Varga³, Bettina Póth-Szebenyi⁴, György Gábor⁵, and Norbert Solymosi^{1,2*}

¹Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078 Budapest, Hungary

²Department of Physics of Complex Systems, Eötvös Loránd University, 1117 Budapest, Hungary

³SZIMBIÓVET Ltd., 9783 Egyházasköd, Hungary

⁴Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, 7400 Kaposvár, Hungary

⁵Androvet Ltd., 1182 Budapest, Hungary

*corresponding author(s): Norbert Solymosi (solymosi.norbert@gmail.com)

ABSTRACT

Sub-clinical mastitis (SM) is the most economically damaging yet often visually undetectable disease of dairy cows. Early detection and treatment can reduce the loss caused by the disease, thus, the continuous improvement of SM diagnostic methods is necessary. Albeit, the somatic cell count (SCC) of milk is commonly measured for diagnostic purposes, its direct determination is not widely used in everyday practice. The primary objective of our work was to investigate whether the predictive value of SM diagnostics can be improved by training artificial neural networks (ANNs) on data generated using common milking machines. The best ANN classifier had a sensitivity of 0.54 and a specificity of 0.77, which is comparable to the performance of several California Mastitis Tests (CMT) in the literature. Combining two diagnostic tests, ANN and CMT, we concluded that the positive predictive value could be up to 50% higher than the value provided by the individual CMT. While the implementation of CMT is a labor-intensive process, in milking parlors where milk or milk yield data can be measured automatically, similar to our work, SCC-gain predictions for all individuals could be obtained on a daily basis.

Introduction

Mastitis, or intramammary infection (IMI), is the most common infectious disease in the dairy cattle industry^{1,2}. Its economic damage is defined by reduced milk production due to mastitis^{1,2} and the work and financial costs of treatment and prevention. 60-70% of antibiotics used in dairy farms are used to prevent or treat mastitis².

Considering the significant economic and animal welfare issues caused^{1,3}, early mastitis detection and treatment is of utmost importance. Despite the 15-40 times higher appearance rates, sub-clinical mastitis (SM), unlike clinical mastitis, does not cause visible symptoms in the udder or milk, but a decrease in milk production and an increase in total milk cell count². As no clinical signs exist, additional tests are required for its diagnosis. Even though, bacterial testing and PCR are the best methods to diagnose IMI currently, they are expensive and time-consuming⁴.

As an increase in the number of cells in milk is an indicator of an inflammatory response, the most commonly used method to detect IMI and assess udder health is to determine the total cell count (somatic cell count, SCC) in milk³⁻⁶. SCC <200,000 cells/mL is considered healthy². However, Ruegg and Pentoja¹ suggest that milk loss is seen as early as SCC 100,000 cells/mL. An SCC of 400,000 cells/mL is clearly considered an IMI. The use of SCC is limited due to the fact that not only the presence of mastitis, but also other factors affect its results¹. Furthermore, its use necessitates trained experts and relatively high expenditure rates⁶. Currently, only few automatic milking systems are capable of automatic SCC detection³. In contrast, milking machines that measure the electroconductivity of milk are widespread³. Although the change in the electrical conductivity of mastitis milk is a long-established phenomenon^{7,8}, its use for IMI detection is less common^{3,6}. Furthermore, readily available indirect tests include the California Mastitis Test (CMT)⁹ that provides approximate information on the amount of somatic cells in individuals by the agglutination of milk-borne immune cells¹⁰. While CMT has the advantage of being simple to perform by one single cow, its herd-level use is impractical. Moreover, its sensitivity and specificity are poor¹⁰, and its evaluation is subjective⁶.

The above-mentioned facts outline the need for a reliable, automatable, rapid MS detection method that could facilitate reduced AB use and improved animal welfare parameters, cure rates, and economic indicators^{3,6}. Several studies suggest that the combination of different indirect detection methods could yield better results in this field.^{4,10}

In our work, we investigated how the combination of automatically collected dairy cow lactation and milk characteristics,

accompanied by CMT parameters, could improve the prediction of increase in SCC. For this, artificial neural networks (ANNs) were trained to classify SCC increase using available, automatically recorded parameters. Subsequently, the resulting ANN-based test was combined with CMT.

Methods

In our study, as in many similar works, SCC above 200,000 cells/ml was considered IMI despite the absence of clinical symptoms. The quality of detection was assessed by the predictive efficiency of CMT, ANN trained by us, or a combination of these. Two measures we used for the evaluation are the negative predictive value ($NPV = (1 - P) \times SE / (P \times (1 - SE) + (1 - P) \times SP)$) and the positive predictive value ($PPV = P \times SE / (P \times SE + (1 - P) \times (1 - SP))$).¹¹ In the formulas, P represents the pre-test probability and SE and SP represent the sensitivity and specificity of the test used, respectively.

In practice, an increase in SCC above 200,000/ml is most often evaluated as a sign of SM. Therefore, we used the SM prevalences reported in the literature to estimate the pre-test probability of elevated SCC. The prevalence values from different countries range widely (Australia: 28.9%^{plozza2011}subclinical; Brazil: 45.4-49.6%^{busanello2017}estimation; Finland: 19.0-22.3%^{hiitio2017}prevalence; Indonesia: 68.2%^{khasanah2021}subclinical). Accordingly, predictive values were estimated for a pre-test probability range of 0.19-0.68.

The classification bias of CMT shows considerable variability in the literature. For our study, we extracted data from publications after 2000 that presented sensitivity and specificity data at the cow level rather than at the udder quarter level. The following value pairs were used in relation to the SCC 200,000 cut-off: SE: 0.69, SP: 0.72¹²; SE: 0.70, SP: 0.48¹³; SE: 0.95, SP: 0.78¹⁴; SE: 0.71, SP: 0.57¹⁰; SE: 0.95, SP: 0.81¹⁵.

Two datasets were used for ANN-based classification. One is from a farm management system (RISKA). In RISKA, each animal is marked with a unique identifier. Data stored in this system include SCC values obtained from one milking each month in each individually labeled cow. In this database, SCC data were available for 18 dates and 1,368 animals in the period 2019-10-28 to 2021-04-27. In the other database (ALPRO), a number of automatically measured milk and milk yield data are stored for each cow and milking.

The two datasets were joined by the unique identifier of the cows, and the measured data for morning milkings were filtered for each individual up to 3 days before the SCC data date. Further on, SCC values were used to create a binomial field as a dependent variable, with a value of 1 if SCC was above 200,000 and 0 below 200,000. Using the functions of the package `caret`¹⁶, we filtered out correlated explanatory variables in R-environment¹⁷ and estimated the variable importance using a binomial generalized linear model. For neural network training, we kept explanatory variables with variable importance values greater than 3: PeakCondLevel (maximum conductivity of the milk during milking in mS), AvgCondLevel (average conductivity of the milk during milking in mS), RelativeCond (expressing the change in conductivity of the milk), Yield (amount of milk delivered in kg), YieldIsLow (binary expression of the decrease in production compared to individual production), number of actual lactations, days in milk associated with the day of SCC measurement; and the PeakCondLevel measured on days 1, 2 and 3 before the day of the SCC measurement. The resulting dataset contained 7,685 records.

The dataset was split into two parts with a 70/30% split. The smaller part served as a test set. The larger part was also split into a training and a validation set in a 70/30% ratio. The number of layers varied from 1 to 4, and the number of neurons per layer varied by steps of 64 between 64 and 512. ANNs were created using all possible combinations. To find the best model, these ANNs were trained, and their classification performance was evaluated. We maximized the sensitivity during the training (50 epochs) while reducing the loss obtained in the validation dataset, with a specificity of 0.9 in the callback. After each epoch, if the sensitivity exceeded the previous maximum, the weights associated with the network were saved. ANNs were trained using TensorFlow¹⁸ on a Tesla V100 32GB GPU. Finally, using the saved weights, we performed the classification on an NVIDIA GeForce P8 2GB GPU using the test set and used the model with the best F1 value ($2TP / (2TP + FP + FN)$) in the subsequent analyses.

When combining ANN and CMTs in the analysis of SCC elevation, the combined sensitivity ($SE_{parallel}$, SE_{serial}) and specificity ($SP_{parallel}$, SP_{serial}) change. Estimation of classification bias in parallel testing: $SE_{parallel} = 1 - (1 - SE_{ANN}) \times (1 - SE_{CMT})$, $SP_{parallel} = SP_{ANN} \times SP_{CMT}$. For sequential testing: $SE_{serial} = SE_{ANN} \times SE_{CMT}$, $SP_{serial} = 1 - (1 - SP_{ANN}) \times (1 - SP_{CMT})$.¹⁹ Where SE_{ANN} and SP_{ANN} are estimated from predictions on the test set using our trained ANN, and SE_{CMT} and SP_{CMT} are sensitivity and specificity, respectively, gathered from the literature^{10,12-15}.

Results

Among the ANNs tested with different architectures, the model with the highest F1 value (0.42) on the test set was a model with 384 neurons in one hidden layer. Comparing the predictions made on the test set with this ANN, the ground truth was $SE_{ANN} = 0.54$ and $SP_{ANN} = 0.77$. The results obtained with this model are presented below.

Predictive values estimated according to the sensitivity and specificity values for each test (ANN and CMT) accompanied by the prevalence values are presented in the top row of Figure 1. Ranking the medians of these estimates in descending order, ANN was ranked 6th in the NPV and 4th in the PPV order.

The well-known phenomenon that NPV decreases while PPV increases with prevalence growth can be observed in each sub-figure. The prediction curves plotted in the second and third rows of Figure 1 show that the parallel combination of ANN and CMT resulted in an improvement in NPV, while the serial combination resulted in an improvement in PPV. Figure 2 summarizes the change in predictive values obtained by combining ANN and CMT in series compared to individual CMT-based prediction results. Among other things, the figure shows that, especially for low prevalences, the ANN+CMT combination significantly increases the reliability of the positive prediction. Compared to individual CMT, the serial combination resulted in a 55% increase in PPV at a prevalence of 20% and 39% at a prevalence of 30%.

Discussion

SM is the most economically damaging, visually undetectable disease of dairy cows. Early detection and treatment can reduce the damage caused by the disease, and continuous improvement of the diagnostics of SM is necessary. Currently, SCC is commonly used in the diagnosis of SM, but its direct determination is not common practice. The primary objective of our work was to investigate whether ANN can be used to improve the diagnosis of SM, using data that are available using standard milking machines. We combined ANN prediction with CMT, a well-known and widely used indirect SM diagnostic method in practice.

Improving SM detection with ANN is not unprecedented in the literature^{4,20,21}. Machine learning models, including ANNs, based on milking data (electrical conductivity, lactose, milk volume, etc.) have been used for SM detection in research. The predictive values of the models used were generally found to be superior to those of traditional statistical approaches. However, the combined approach we present was not found in the literature. Since, from a diagnostic point of view, it is more important to find positive individuals, the practical goal was to increase the PPV, which can be achieved by increasing the specificity of the test. Accordingly, we varied the neural network weights during training to increase the sensitivity by keeping the specificity value high. In general, the classification efficiency of models is evaluated by the ROC AUC value⁴. However, maximizing the ROC AUC parameter does not mean maximizing specificity.

The prediction performance estimated from ANN was found to be better than the prediction performance of two CMTs for PPV and one CMT for NPV. According to these results, the prediction performance of ANN is comparable to CMT for both predictive values. While the implementation of CMT is a labor-intensive process, we can obtain SCC gain predictions for all individuals on a daily basis in milking parlors where milk or milk yield data similar to those used in our study can be measured automatically. This does not mean that the neural network and weights we have trained can be used on all farms directly. Nevertheless, we believe the pipeline presented can be adapted quickly in farms with similar source data.

The combination of various tests is a solution that is often applied in epidemiology to improve the predictive value of diagnostic tests. When interpreting the results obtained from a combination of tests, it is important to note that the elemental assumption is that the tests used must be independent of each other. The two tests used in our work detect an increase in SCC on a different basis. CMT is based on higher amounts of DNA deriving from higher numbers of cells in milk, while ANN uses independent features of the milk. Since the two tests are thus uncorrelated, the predictions from their combination can be considered reasonable. A parallel or serial combination of two tests is possible. In the former case, the sensitivity of the combined test will be higher than that of the individual tests used; in the latter case, the specificity will be higher. For SM, this has been pointed out by other authors as well.¹⁰ In these works, the combinations of different tests for the indirect detection of IMI were evaluated. According to their conclusion, the combination of SCC and CMT or milk electrical conductivity only resulted in modest improvements in diagnostics compared to the use of CMT or milk electroconductivity alone.¹⁰ However, no data were found on how the combination of ANN and CMT changes the predictive values. Figure 1 shows that the combination of ANN and CMT improves the predictive values to the individual tests. If, as in the model selection of ANNs, the goal of combining tests was to increase PPV, which can be attained by increasing specificity, we can achieve it by using serial testing.

Since pre-test probability is one of the parameters in estimating predictive values, NPV and PPV depend on its value. Therefore, we used different prevalence values found in the literature in the estimations to show the extent of change in the predictive value in practically feasible circumstances. The same guided us by the collection of literature data on the diagnostic reliability of CMT. Although we aimed for prevalence, sensitivity, and specificity literature data that included documentation of SCC cut-off values of 200,000, there are heterogeneities in the formulation, evaluation, and presentation of the results of the studies used.

The inclusion of other automatically measurable parameters (e.g. feed intake, exercise activity) could complete and improve the presented model. Further studies are needed to test our approach in practice and compare the predictions with gold standard methods.

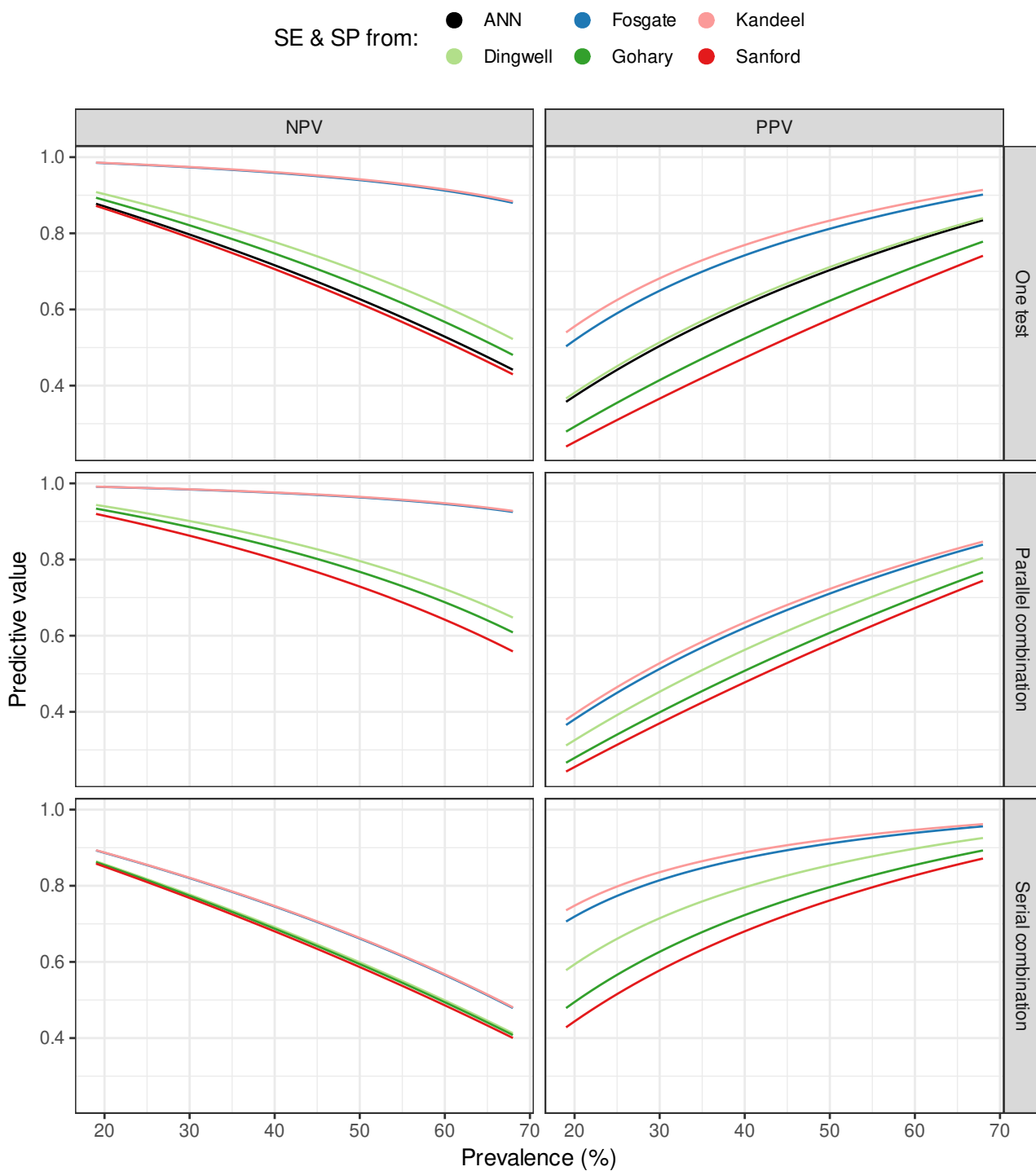


Figure 1. Predictive values. Row 'One test' shows the negative (NPV) and positive (PPV) predictive values estimated for different prevalences using the sensitivity and specificity values of the individual tests (ANN and CMT). The second row shows the predictive values estimated using the classification bias of the tests combined in parallel. The third row pictures the same performed serially (ANN+CMT).

SE & SP from: ● Dingwell ● Fosgate ● Gohary ● Kandeel ● Sanford

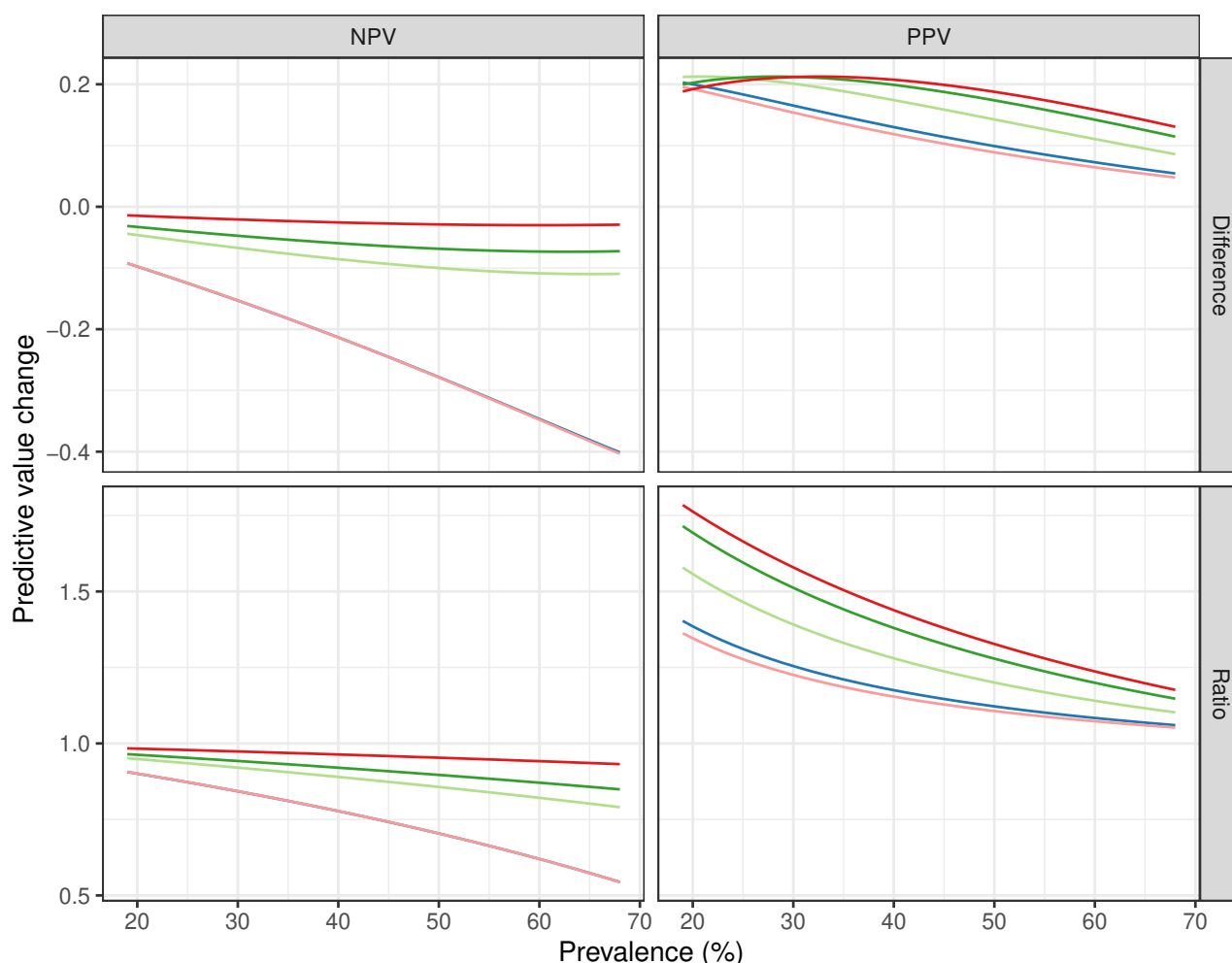


Figure 2. Serial combined prediction changes. The difference row shows the difference in the predictive value of the individual CMT tests extracted from the predictive value of the serial combined (ANN+CMT) tests. The ratio row shows the ratio of the predictive value of the serially combined (ANN+CMT) tests to the predictive value of the individual CMT tests

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The study was supported by the European Union project RRF-2.3.1-21-2022-00004 within the framework of the MILAB Artificial Intelligence National Laboratory.

Author contributions statement

NS takes responsibility for the data integrity and the data analysis's accuracy. IC and NS conceived the concept of the study. NS and SÁN participated in the computing, statistical analysis, and drafting of the manuscript. BP, GG, IC, NS, SÁN, and TV carried out the manuscript's critical revision for important intellectual content. All authors read and approved

Authors' information

No relevant information can be provided by the authors that may aid the readers' interpretation of the article.

References

1. Ruegg, P. & Pantoja, J. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. *Ir. J. Agric. Food Res.* 101–117 (2013).
2. Cobirka, M., Tancin, V. & Slama, P. Epidemiology and classification of mastitis. *Animals* **10**, 2212 (2020).
3. Silva, S. R. *et al.* Precision technologies to address dairy cattle welfare: Focus on lameness, mastitis and body condition. *Animals* **11**, 2253 (2021).
4. Bobbo, T., Biffani, S., Taccioli, C., Penasa, M. & Cassandro, M. Comparison of machine learning methods to predict udder health status based on somatic cell counts in dairy cows. *Sci. Reports* **11**, 1–10 (2021).
5. Schwarz, D., Lipkens, Z., Piepers, S. & De Vliegher, S. Investigation of differential somatic cell count as a potential new supplementary indicator to somatic cell count for identification of intramammary infection in dairy cows at the end of the lactation period. *Prev. veterinary medicine* **172**, 104803 (2019).
6. Wang, Y., Kang, X., He, Z., Feng, Y. & Liu, G. Accurate detection of dairy cow mastitis with deep learning technology: a new and comprehensive detection method based on infrared thermal images. *animal* **16**, 100646 (2022).
7. Janzekovic, M. *et al.* Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *J. achievements materials manufacturing engineering* **34**, 39–46 (2009).
8. Ferrero, F., Valledor, M. & Campo, J. Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement* **47**, 855–860 (2014).
9. Schalm, O. & Noorlander, D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **130**, 199–204 (1957).
10. Gohary, K. & McDougall, S. Predicting intramammary infection status at drying off using indirect testing of milk samples. *New Zealand veterinary journal* **66**, 312–318 (2018).
11. Thrusfield, M. & Christley, R. *Veterinary epidemiology*, chap. Diagnostic testing (John Wiley & Sons, 2018), 4th edn.
12. Dingwell, R. T., Leslie, K. E., Schukken, Y. H., Sargeant, J. M. & Timms, L. L. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *The Can. Vet. J.* **44**, 413 (2003).
13. Sanford, C. *et al.* Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prev. Vet. Medicine* **77**, 96–108 (2006).
14. Fosgate, G. T., Petzer, I.-M. & Karzis, J. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. *The Vet. J.* **196**, 98–102 (2013).
15. Kandeel, S., Megahed, A., Arnaout, F. & Constable, P. Evaluation and comparison of 2 on-farm tests for estimating somatic cell count in quarter milk samples from lactating dairy cattle. *J. veterinary internal medicine* **32**, 506–515 (2018).
16. Kuhn, M. *caret: Classification and regression training* (2023). R package version 6.0-93.
17. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2023).
18. Abadi, M. *et al.* TensorFlow: Large-scale machine learning on heterogeneous systems (2015). Software available from <https://www.tensorflow.org>.
19. Marshall, R. J. The predictive value of simple rules for combining two diagnostic tests. *Biometrics* 1213–1222 (1989).
20. Mammadova, N. M. & Keskin, I. Application of neural network and adaptive neuro-fuzzy inference system to predict subclinical mastitis in dairy cattle. *Indian J. Animal Res.* **49**, 671–679 (2015).
21. Ebrahimi, M., Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Ebrahimi, E. & Petrovski, K. R. Comprehensive analysis of machine learning models for prediction of sub-clinical mastitis: Deep learning and gradient-boosted trees outperform other models. *Comput. biology medicine* **114**, 103456 (2019).

10.4. Bacterial colony size growth estimation by deep learning

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2023.04.25.538361>; this version posted April 29, 2023. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Bacterial colony size growth estimation by deep learning

Sára Ágnes Nagy¹, László Makrai², István Csabai³, Dóra Tózsér¹, Géza Szita¹, and Norbert Solymosi^{1,3*}

¹Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078 Budapest, Hungary

²Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine, 1143 Budapest, Hungary

³Department of Physics of Complex Systems, Eötvös Loránd University, 1117 Budapest, Hungary

*corresponding author(s): Norbert Solymosi (solymosi.norbert@gmail.com)

ABSTRACT

The bacterial growth rate is important for pathogenicity and food safety. Therefore, the study of bacterial growth rate over time can provide important data from a medical and veterinary point of view. We trained convolutional neural networks (CNNs) on manually annotated solid medium cultures to detect bacterial colonies as accurately as possible. Predictions of bacterial colony size and growth rate were estimated from image sequences of independent *Staphylococcus aureus* cultures using trained CNNs. A simple linear model for control cultures with less than 150 colonies estimated that the mean growth rate was 60.3 $\mu\text{m}/\text{h}$ for the first 24 h. Analyzing with a mixed effect model that also takes into account the effect of culture, smaller values of change in colony size were obtained (control: 51.0 $\mu\text{m}/\text{h}$, rifampicin pretreated: 36.5 $\mu\text{m}/\text{h}$). An increase in the number of neighboring colonies clearly reduces the colony growth rate in the control group but less typically in the rifampicin-pretreated group. Based on our results, CNN-based bacterial colony detection and the subsequent analysis of bacterial colony growth dynamics might become an accurate and efficient tool for bacteriological work and research.

Introduction

Bacteria reproduce by simple division, the rate of which is fundamentally influenced by the environment and the characteristics of the bacterium. The rate of bacterial multiplication is important for pathogenicity¹⁻³ and food safety⁴. Therefore, the study of bacterial growth (multiplication rate) per unit of time can provide important data from a medical and veterinary point of view. Several developments for the automated monitoring of the growth rate exist. In liquid cultures, the quantification of turbidity (optical density), electrical conductivity, or redox potential can be used for this purpose.^{5,6} When cultured on solid media, the growth rate is estimated from the change in bacterial colony size. The most common solutions⁷⁻¹¹ involve digital image analysis, used to detect colonies and then measure their size relying on a threshold-based approach. In comparison, sub-pixel correlation analysis in speckle imaging is a new frontier for this task.¹²

At the same time, the detection of bacterial colonies using neural networks is a promising approach^{13,14}. However, when the aim is only to detect and count bacterial colonies, it is not necessary for the colony identifying feature (e.g. polygon, bounding box) to have the same size as the target colony. On the contrary, if we want to study growth rates, we need to be able to measure the size of the detected colonies as accurately as possible. This also means that we need to perform model selection according to such predictive measures of neural networks in order to obtain the most accurate results.

The aim of our work was to investigate the possibility of reproducing the bacterial colony growth results of Bär et al.,¹¹ using a convolutional neural network (CNN) previously trained on our annotated digital image dataset.

Methods

To detect bacterial colonies in the Detectron2¹⁵ environment, 10 pre-trained Faster R-CNN models (R_50_C4_1x, R_50_C4_C4_3x, R_50_DC5_1x, R_50_DC5_3x, R_50_FPN_1x, R_50_FPN_3x, R_101_C4_C4_3x, R_101_DC5_3x, R_101_FPN_3x, X_101_32x8d_FPN_3x) were trained. For this purpose, our research group has previously created a manually annotated dataset (with bounding boxes enclosing the colonies). Since the images were of different sizes, they were transformed to a uniform size (6200 × 6200 pt) for training. Each pre-trained model was trained through 100 epochs and validated after every 100 iterations. During validation, we always recorded weights with a smaller validation loss compared to the previous smallest weights. Thus, the training resulted in a collection of the best weights for each of the 10 pre-trained models.

We performed bacterial colony detection predictions using the best weights and an independent image collection. The dataset used to investigate bacterial colony growth consisted of the unannotated digital images generated and shared on Figshare

by Bärre et al.¹¹. The authors took digital images of 22 *Staphylococcus aureus* cultures in every 10 min. From each culture, 410 or 423 recordings were made. Of the 22 cultures, 8 were control (Ctrl), and 14 were pretreated with rifampicin (Rifa) for 24 h immediately prior to culturing (Table 1/A). Based on best weights, bacterial detection prediction was performed for images numbered 1-410. For the 410 records of 22 cultures (transformed to 6200 × 6200 pt), predictions (bounding box coordinates, object classification probability) obtained with each model were stored. CNN training and predictions were performed on a Tesla V100 32GB GPU.

Further processing of the data and plotting of the results were done in R-environment (v4.2.1)¹⁶ using the packages broom¹⁷, broom.mixed¹⁸, ggplot2¹⁹, sf²⁰, tmap²¹, and xtable²². The bounding boxes around the colonies that were predicted with each model's best weights were later filtered; only those with object prediction probabilities above 0.5 were retained for further analyses. Simple feature polygons were generated from their coordinates. From the predicted objects at 410 recording time, the ones with an object prediction probability greater than 0.95 were extracted. These represented the final state and size of the colonies. Based on our experience, we assumed that in the case of *S. aureus*, the colonies' center does not shift significantly during growth. Therefore, when tracking the growth of colonies, we assumed that the bounding box describing the latest state of the colony mostly contains the area determined during the previous examinations. Accordingly, for each bounding box describing the final colony state, we extracted the bounding boxes predicted at the previous time points that fell completely within the final one. A series of these were used to estimate the growth rate of the colonies. The growth rate of bacterial colonies is influenced by how densely they are distributed in the culture. The number of other colonies in the surroundings of each colony that can affect its growth was characterized by the number of close neighbors (NB). We considered two colonies as close neighbors if the bounding boxes between them overlapped to any extent. In order to compare our results with the work of Bärre et al.¹¹, we used the radius of the colonies to describe their size. We estimated the colony radius by taking half of the width of the predicted bounding boxes. The 10 models were evaluated by analyzing the series of the best weight predictions for all colonies. We selected the model that produced the largest number of elements in the series for each colony and the smallest radius based on the bounding boxes. Thus, the best model was created by training the pre-trained model X_101_32x8d_FPN_3x; therefore, the predictions obtained with this model are presented in further sections.

To estimate the appearance time of colonies for each culture, we extracted CNN's first identified member of a colony growth series. For comparability with the Bärre et al.¹¹ results, we used the per-plate linear model to estimate colony growth. Statistically, measurements on the same plate can be considered repeated measurements; therefore, we also used a mixed-effect linear model to estimate colony growth by treating the plate as a random factor. Following the work of Bärre et al.,¹¹ we used the colony growth rates predicted during the first 24 h of culturing.

Results

Regardless of the number of colonies, the trained neural network processed a single culture record in 0.31 seconds. This time included converting the image to a uniform size, predicting the bounding box of the colonies, and tabulating the data describing them. The bounding boxes on an arbitrary image of the Ctrl_1 culture are shown in Figure 1.

Fig 2 shows the time when the first colonies were detected in each culture. While the median time to first colony detection in the Ctrl group was 9.4 h, the median time to first colony detection in the Rifa group was 13.2 h, with a difference of 3.8 h.

The growth curves of colonies are shown in Figure 3. Following the approach of Bärre et al.,¹¹ we estimated the linear growth trend per culture for the first 24 h (Table 1). The average growth rate for Ctrl plates with less than 150 colonies was 60.3 $\mu\text{m}/\text{h}$ (SD: 5.6). Using a mixed effect model, colony growth rate estimates for Ctrl and Rifa groups are summarized in Table 1.

Discussion

The best model detected all colonies in the figure in 0.31 seconds, regardless of the number of colonies. Bärre et al.¹¹ provided partial detection times for 16 cultures in their Supplementary Table 3, giving a mean per image of 8.8 s (SD: 7.35 s), which is 28 times our CNN result.

The median time to detect the first colonies in the Ctrl group (9.4 h) was 0.4 h later than that reported by Bärre et al.¹¹ (9 h). In the Rifa group, however, instead of 17.4 h¹¹, we obtained 13.2 h as the median of the appearance times. Thus, instead of 8.4 h¹¹, we obtained a 3.8 h difference in the median of the appearance times of the first colonies in the two groups.

The hourly colony growth rates for the first 24 h in Ctrl group with less than 150 colonies were estimated by Bärre et al.¹¹ to be 60.4 μm . Using the same statistical approach, our trained CNN estimated 60.3 μm , a difference of only 0.1 μm (1%). However, due to repeated measurements, we believe that a more correct approach is to use the mixed-effect model, which yields 58.7 μm for the same subset, with a 1.7 μm difference (2.8%) from the reference. For estimates that do not consider the number of neighbors, we can see that the rate for cultures with less than 150 colonies is always higher than the rate calculated from the sum of all cultures. This is more substantial in the Ctrl group (7.7 $\mu\text{m}/\text{h}$) and less in the Rifa group (2.6 $\mu\text{m}/\text{h}$). In both approaches, the Ctrl group shows that the growth rate decreases with the increasing number of neighbors up to the subgroup

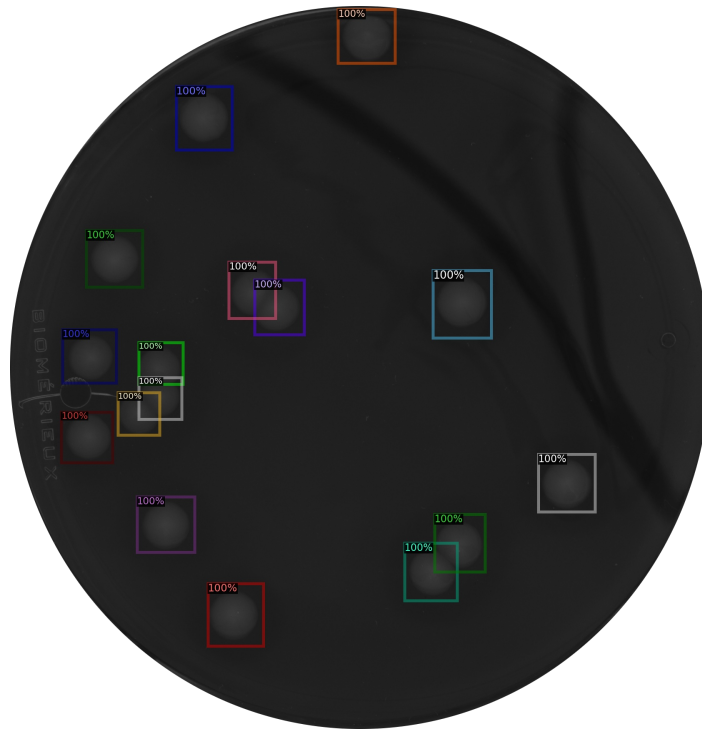


Figure 1. Bounding boxes on an image of Ctrl_1 culture predicted by the neural network. The colors have no meaning, they only aid separation in the case of overlapping boxes. The percentages indicate the confidence the algorithm assigned to the detected object

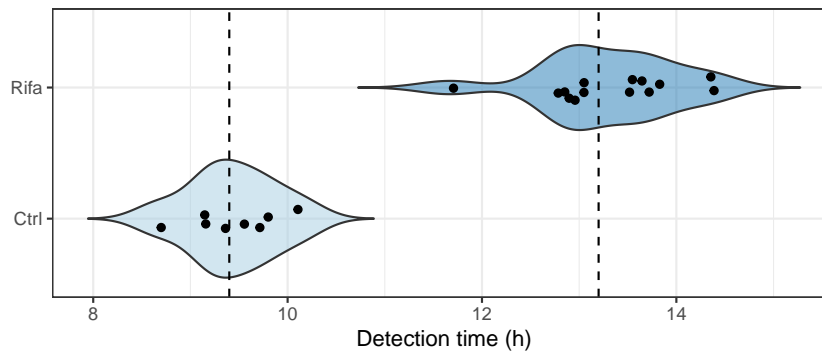


Figure 2. The time until the detection of the first colony in each culture in the two groups. Dashed lines indicate the median of the groups.

with 3 neighbors. Those with 4 neighbors show an increased growth rate, however, as Table 1 shows, the number of colonies with 4 neighbors is very low, therefore, the estimates for these are not really reliable. In the analyses using all Rifa cultures, we see that colonies without close neighbors grow at a lower rate than those with close neighbors, among which the increase in the number of close neighbors indicates a clear decrease in rate. No such regularity is seen in the Rifa cultures, with less than 150 colonies. Comparing Figure 3 showing the growth curves of colonies with the Supplementary Figure 10 of Bär et al.,¹¹ we see that the final colony sizes of our estimates exceed in several plates the values presented by Bär et al.¹¹ for the same ones. A

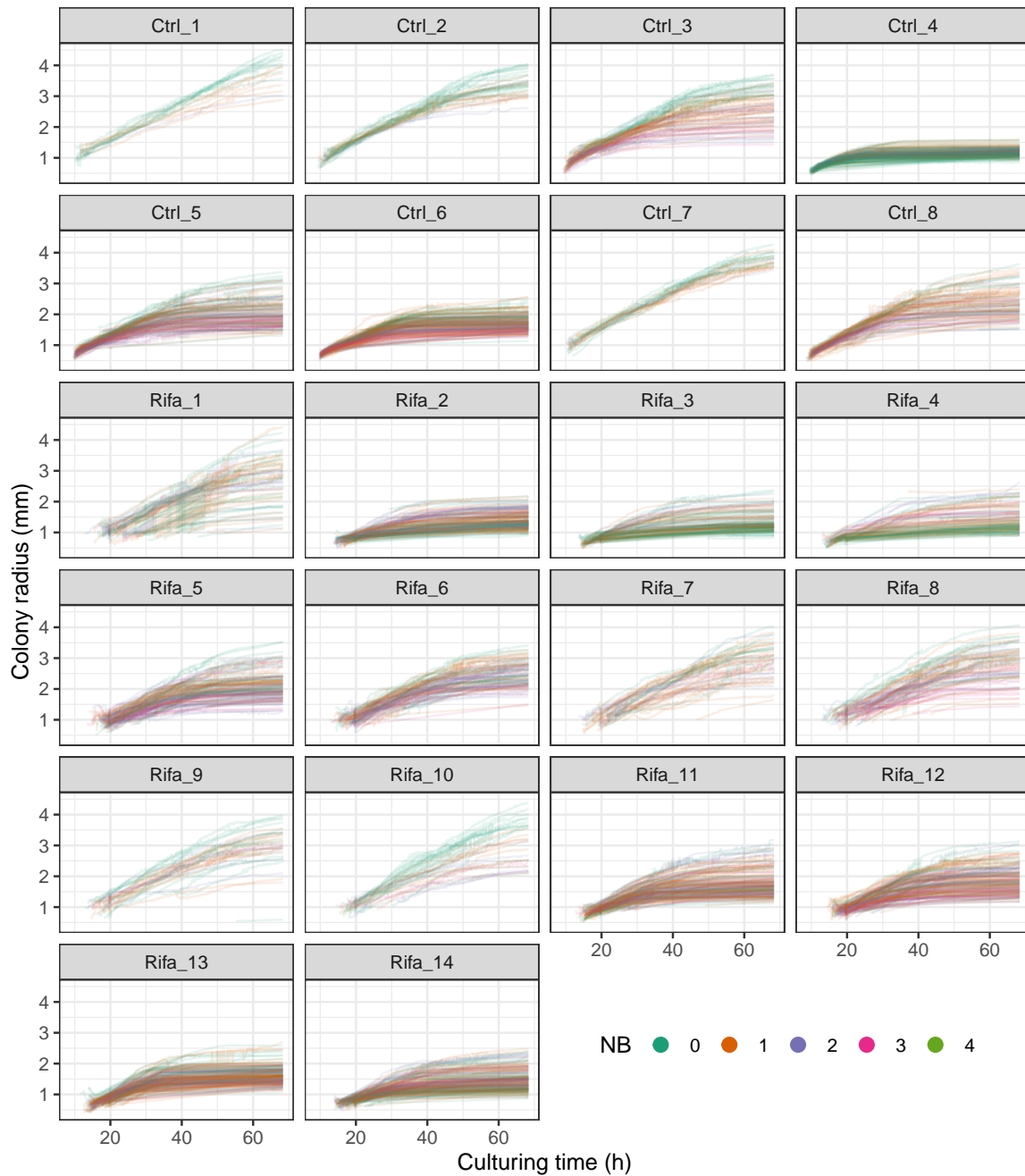


Figure 3. Growth curves of the colonies. Each curve describes the change in the radius size of a single colony (in Table 1, TN columns indicate their number). Their color indicates the number of close neighbors (NB) of the colony

visual inspection of the different cultures indicates that while the predicted bounding boxes are narrower in the case of the smaller colonies, more closely approximating the boundaries of the colonies, they can deviate significantly in the large colonies.

Table 1. Hourly growth rate of the bacterial colony radius during the first 24 h. Table A shows values estimated by linear regression in each culture. The plate identifiers, taken from the name of the library of digital images hosted on Figshare by Bär et al.,¹¹ are the number of colonies tracked in the TN column, the ID column is the culture identifier used in the paper of Bär et al.,¹¹ and the N column is the number of colonies per culture. Table B shows the estimates of the radius growth within treatment groups using mixed-effect linear regression. Column NB indicates an additional grouping variable, the numbers indicate the number of close neighbors of colonies. The row without an NB value shows the estimates for all colonies.

A)					
Plate	TN	Estimate ($\mu\text{m}/\text{h}$)	SE	Bär et al. ¹¹ ID	N
Ctrl_1	16	55.3	0.84	21	16
Ctrl_2	31	66.3	0.51	22	31
Ctrl_3	76	56.8	0.45	20	78
Ctrl_4	200	36.4	0.28	19	1,186
Ctrl_5	134	50.6	0.29	18	162
Ctrl_6	180	44.2	0.25	15	275
Ctrl_7	22	66.6	0.71	16	23
Ctrl_8	90	56.7	0.33	17	102
Rifa_1	54	16.3	2.52	5	71
Rifa_2	214	33.8	0.70	6	925
Rifa_3	165	42.4	0.73	7	1,200
Rifa_4	153	41.2	0.95	8	1,509
Rifa_5	136	23.2	1.45	10	158
Rifa_6	91	31.6	1.29	9	93
Rifa_7	43	37.6	2.30	11	44
Rifa_8	68	34.3	1.86	12	76
Rifa_9	36	40.4	2.15	13	40
Rifa_10	29	46.8	2.20	14	33
Rifa_11	181	40.6	0.67	1	288
Rifa_12	166	29.3	1.01	2	207
Rifa_13	206	44.4	0.59	3	425
Rifa_14	215	33.1	0.61	4	662

B)							
Group	TN	NB	All plates Estimate SE ($\mu\text{m}/\text{h}$)		TN	Plates with N<150 Estimate SE ($\mu\text{m}/\text{h}$)	
Ctrl	749		51.0	0.14	235	58.7	0.22
	233	0	53.1	0.28	66	65.0	0.42
	277	1	52.9	0.23	99	58.9	0.34
Rifa	177	2	48.2	0.23	52	53.0	0.40
	55	3	43.2	0.35	15	51.4	0.65
	7	4	48.2	0.75	3	55.6	0.77
	1757		36.5	0.29	321	33.9	0.79
Rifa	490	0	35.2	0.65	87	37.3	1.60
	665	1	38.6	0.43	119	42.4	1.31
	432	2	37.0	0.55	80	28.8	1.50
	139	3	36.1	0.76	31	31.0	1.82
	31	4	35.4	1.66	4	26.3	5.76

If the aforementioned minimal deviation in growth rates in the first 24 hours is reconsidered in this light, it can be explained by the fact that until the end of that period, the colonies are still quite small, and the predictions do not distort the size of the bounding box. We believe that the more inaccurate bounding box estimation of large colonies may be because the images used in the training set were taken from cultures that were incubated for 24-48 hours. As a consequence, only a few colonies could have grown as large as on the 68-hour cultures of Bär et al.¹¹ This imprecision could be reduced by using a training set that includes longer incubation time with larger colonies.

Based on our results, we believe that CNN-based bacterial colony detection and bacterial colony growth dynamics analyses could become an effective tool for bacteriological work and research.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The study was supported by the European Union project RRF-2.3.1-21-2022-00004 within the framework of the MILAB Artificial Intelligence National Laboratory.

Author contributions statement

NS takes responsibility for the data's integrity and the data analysis's accuracy. IC and NS conceived the concept of the study. NS and SÁN participated in the computing, statistical analysis, and drafting of the manuscript. DT, GS, IC, LM, NS, and SÁN carried out the manuscript's critical revision for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

No relevant information can be provided by the authors that may aid the readers' interpretation of the article.

References

1. Anderson, J., Eftekhar, F., Aird, M. & Hammond, J. Role of bacterial growth rates in the epidemiology and pathogenesis of urinary infections in women. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 766–771 (1979).
2. Fisher, R. A., Gollan, B. & Helaine, S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 453–464 (2017).
3. Bourchookarn, A., Paddock, C., Macaluso, K. & Bourchookarn, W. Association between growth rate and pathogenicity of spotted fever group *Rickettsia*. *J Pure Appl Microbiol* **16**.
4. McMeekin, T. *et al.* Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg. infectious diseases* **3**, 541 (1997).
5. Madrid, R. E., Felice, C. J. & Valentinuzzi, M. E. Automatic on-line analyser of microbial growth using simultaneous measurements of impedance and turbidity. *Med. & biological engineering & computing* **37**, 789–793 (1999).
6. Lindqvist, R. Estimation of staphylococcus aureus growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Appl. environmental microbiology* **72**, 4862–4870 (2006).
7. Levin-Reisman, I. *et al.* Automated imaging with scanlag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat. methods* **7**, 737–739 (2010).
8. Levin-Reisman, I., Fridman, O. & Balaban, N. Q. Scanlag: high-throughput quantification of colony growth and lag time. *J. visualized experiments: JoVE* (2014).
9. Barr, D. A. *et al.* Serial image analysis of mycobacterium tuberculosis colony growth reveals a persistent subpopulation in sputum during treatment of pulmonary tb. *Tuberculosis* **98**, 110–115 (2016).
10. Vulin, C., Leimer, N., Huemer, M., Ackermann, M. & Zinkernagel, A. S. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nat. communications* **9**, 4074 (2018).
11. Bär, J., Boumasmoud, M., Kouyos, R. D., Zinkernagel, A. S. & Vulin, C. Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Sci. Reports* **10**, 16084, DOI: [10.1038/s41598-020-72979-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-72979-4) (2020).
12. Balmages, I. *et al.* Use of the speckle imaging sub-pixel correlation analysis in revealing a mechanism of microbial colony growth. *Sci. Reports* **13**, 2613 (2023).
13. Majchrowska, S. *et al.* Agar a microbial colony dataset for deep learning detection. *arXiv preprint arXiv:2108.01234* (2021).
14. Pawłowski, J., Majchrowska, S. & Golan, T. Generation of microbial colonies dataset with deep learning style transfer. *Sci. Reports* **12**, 5212 (2022).
15. Yuxin Wu and Alexander Kirillov and Francisco Massa and Wan-Yen Lo and Ross Girshick. Detectron2. <https://github.com/facebookresearch/detectron2> (2019).
16. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2022).
17. Robinson, D., Hayes, A. & Couch, S. *broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles* (2023). R package version 1.0.4.
18. Bolker, B. & Robinson, D. *broom.mixed: Tidying Methods for Mixed Models* (2022). R package version 0.2.9.4.
19. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York, 2016).
20. Pebesma, E. Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. *The R Journal* **10**, 439–446, DOI: [10.32614/RJ-2018-009](https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009) (2018).
21. Tennekes, M. tmap: Thematic maps in R. *J. Stat. Softw.* **84**, 1–39, DOI: [10.18637/jss.v084.i06](https://doi.org/10.18637/jss.v084.i06) (2018).
22. Dahl, D. B., Scott, D., Roosen, C., Magnusson, A. & Swinton, J. *xtable: Export Tables to LaTeX or HTML* (2019). R package version 1.8-4.

10.5. Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection

www.nature.com/scientificdata

scientific data



OPEN

DATA DESCRIPTOR

Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection

László Makrai¹, Bettina Fodróczy^{1,2}, Sára Ágnes Nagy², Péter Czeiszing^{1,2}, István Csabai³, Géza Szita² & Norbert Solymosi^{2,3}✉

Quantifying bacteria per unit mass or volume is a common task in various fields of microbiology (e.g., infectiology and food hygiene). Most bacteria can be grown on culture media. The unicellular bacteria reproduce by dividing into two cells, which increases the number of bacteria in the population. Methodologically, this can be followed by culture procedures, which mostly involve determining the number of bacterial colonies on the solid culture media that are visible to the naked eye. However, it is a time-consuming and laborious professional activity. Addressing the automation of colony counting by convolutional neural networks in our work, we have cultured 24 bacteria species of veterinary importance with different concentrations on solid media. A total of 56,865 colonies were annotated manually by bounding boxes on the 369 digital images of bacterial cultures. The published dataset will help developments that use artificial intelligence to automate the counting of bacterial colonies.

Background & Summary

In microbiology, the colony-forming unit (CFU) is used to determine the number of viable bacteria that can grow on solid media¹. In all cases, CFU values can only be interpreted when normalized to a unit volume (e.g., ml). In clinical microbiology, food hygiene, and vaccine research, quantification of CFU is essential. The CFU count is most commonly estimated by counting the number of colonies on solid culture media. As the estimation of the number of living bacteria is often a key, but at the same time the process of colony counting is rather time-consuming and labour-intensive, there have been several attempts in the literature to automate the procedure. A number of tools (EBImage², ImageJ³, OpenCFU⁴, AutoCellSeg⁵, CFUCounter⁶) have been developed and are used for colony counting, which has some predefined threshold (e.g., color) and counts the resulting objects. Although they can be of great help in laboratory work, it is important to be aware of their drawbacks. A general limitation of these solutions is that objects in the image that are not colonies (e.g., pieces of the wall of a Petri dish, air bubbles) may also appear in the result as colonies. Although some tools allow these erroneous detections to be corrected manually, this again requires time-consuming expert work. Also limiting their everyday use is that most of them cannot count colonies if the number of colonies in the Petri dish is too high⁶. The use of artificial intelligence (AI) to automate colony counting seems obvious. In the AI approach, colony counting is first an object detection problem. A further task could be the differentiation of bacterial species, which requires classification solutions. By these approaches, one can obtain the total and per-class CFU count by counting the detected and classified objects to estimate the total and per-species CFU counts. There are several machine-learning approaches available to solve this kind of problem. Nowadays, convolutional neural networks (CNNs) are probably the most efficient tools in this field^{7–10}, and there are efforts to use CNNs to automate colony counting^{11–13}. In line with these authors, the aim of our research group was to train CNNs to estimate CFU automatically. The availability of as many digital images of annotated bacterial cultures as possible is a prerequisite for colony detection and classification with CNN. We could not find a similar public, freely available dataset to use for our own CNN-based development when we started our work.

The aim of creating the dataset presented here was to build a collection of digital records of bacterial cultures performed under everyday laboratory conditions on solid media. In creating such datasets, the question arises as to whether the digital images should be produced under some highly controlled, standardized conditions or

¹Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine, 1143, Budapest, Hungary.

²Centre for Bioinformatics, University of Veterinary Medicine, 1078, Budapest, Hungary. ³Department of Physics of Complex Systems, Eötvös Loránd University, 1117, Budapest, Hungary. ✉e-mail: solymosi.norbert@gmail.com

Bacteria species	ID	Gram	Culturing	Agar	Required	
					NAD	CO ₂
<i>Actinobacillus equuli</i>	sp01	–	aerobic	blood		
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	sp02	–	aerobic	chocolate	+	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	sp03	–	aerobic	blood		
<i>Bacillus cereus</i>	sp04	+	aerobic	blood		
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	sp05	–	aerobic	blood		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	sp06	–	aerobic	blood		
<i>Brucella ovis</i>	sp07	–	aerobic	blood		+
<i>Clostridium perfringens</i>	sp08	+	anaerobic	blood		
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	sp09	+	aerobic	blood		
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	sp10	+	aerobic	blood		
<i>Escherichia coli</i>	sp11	–	aerobic	nutrient		
<i>Glaesserella parasuis</i>	sp12	–	aerobic	chocolate	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	sp13	–	aerobic	blood, nutrient		
<i>Listeria monocytogenes</i>	sp14	+	aerobic	blood		
<i>Paenibacillus larvae</i>	sp15	+	aerobic	blood		+
<i>Pasteurella multocida</i>	sp16	–	aerobic	blood		
<i>Proteus mirabilis</i>	sp17	–	aerobic	MacConkey		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sp18	–	aerobic	blood		
<i>Rhodococcus equi</i>	sp19	+	aerobic	blood		
<i>Salmonella enterica</i>	sp20	–	aerobic	nutrient		
<i>Staphylococcus aureus</i>	sp21	+	aerobic	blood		
<i>Staphylococcus hyicus</i>	sp22	+	aerobic	blood		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	sp23	+	aerobic	blood		
<i>Trueperella pyogenes</i>	sp24	+	aerobic	blood		

Table 1. The bacterial species included in the data set. The ID column contains the unique identifier of the species, while the third column contains its Gram-staining characteristics. The culture column shows whether the bacterium requires an aerobic or anaerobic environment, and the agar column shows the medium in which it is grown. The last two columns indicate whether the species requires nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) or CO₂ during incubation.

in a way that could presumably be produced anywhere. The former solution may obviously lead to more accurate results on a given dataset, but the latter may open up the possibility of extendibility. In creating the dataset presented here and made freely available, we chose the latter approach, using mobile phones to take 369 digital images of cultures of 24 bacterial species on solid media, annotating a total of 56,865 bacterial colonies.

Methods

Culturing of bacterial species. Our studies have cultured 24 bacterial species of veterinary importance (Table 1). These are species whose disease processes can cause significant economic damage in farm animals, which can cause disease in companion animals, and which are important for the safety of food products. Bacterial cultures were obtained from the bacterial strain collection of the Bacteriology Laboratory, Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine, where the bacterial strains were stored in an ultra-low freezer at -80°C . Before each strain is stored in the collection, its bacterial species is identified by MALDI-TOF MS. Different media were used depending on the requirements of each bacterial species (Table 1).

Several steps were necessary to obtain the bacterial cultures we later used to make digital images. On the first day, the frozen strains were inoculated onto the appropriate culture medium for the bacteria and incubated under conditions appropriate to the requirements of the bacteria. On the second day, a typical colony from the culture was inoculated onto a fresh medium and incubated. On the third day, a colony of bacteria was inoculated into tryptone soy broth (TSB) using a sterile cotton swab and incubated at 37°C for 24 hours. The cultures were then used to prepare a dilution series on a decimal basis using sterile physiological saline suspension. In the first step of the dilution (basic dilution), 0.1 ml of the initial culture was first pipetted into a test tube containing 9.9 ml sterile saline, and the suspension was thoroughly homogenized (10^{-2} dilution). Then 0.5 ml of this suspension was pipetted into a test tube containing 4.5 ml of sterile physiological saline solution. This gave the 10^{-3} dilution. The latter step of the dilution was carried out up to the 10^{-6} dilution (further dilutions).

Each member of the dilution series was homogenized by vortexing for 10 seconds. Subsequently, 50 μl per dilution of the dilutions was taken from each medium and distributed over the surface of the medium using a sterile glass rod with circular movements. After a final incubation at 37°C for 24–48 hours, digital images of the Petri dishes containing the cultures were taken. The bacteria were inoculated, and dilutions were performed in a BSL2 safety cabinet. Incubation was done in a thermostat.

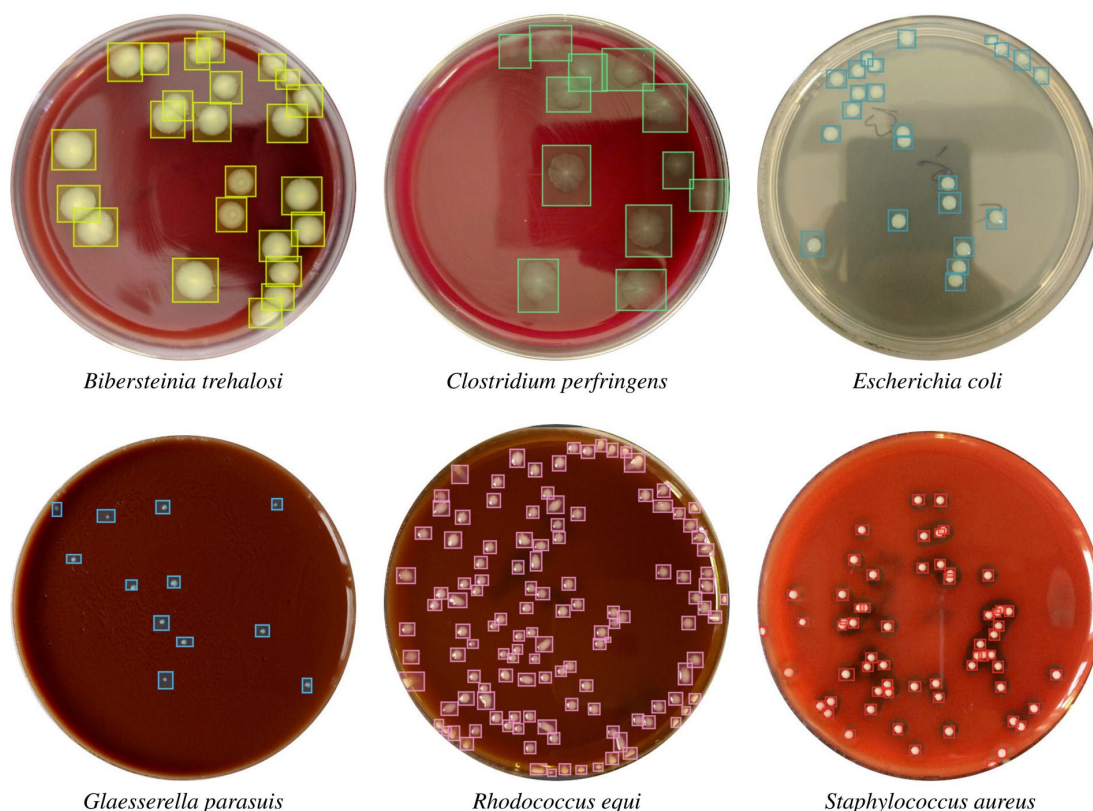


Fig. 1 Six of 24 bacterial species cultures in Petri dishes with characteristic colonies annotated by bounding boxes. Each species has been cultured on the appropriate medium, e.g., *B. trehalosi*, *C. perfringens*, *R. equi* or *S. aureus* on blood agar, *G. parasuis* on chocolate agar and *E. coli* on nutrient agar.

Digitalization and annotation. For the digitalization, three different mobile phones (LG Nexus 5X, iPhone 6, and HUAWEI P30 Lite) were used so that the variability of the devices could be accounted for in the data set. For the same purpose, black and white backgrounds for the dishes were used to take the photos. Care was taken to ensure that the camera on the phone was parallel to the plane of the Petri dish.

The digital images were uploaded to a server where an expert using COCO Annotator v0.11.1 (<https://github.com/jsbroks/coco-annotator/>) drew a bounding box around each colony and labeled the identified unit with the bacterial species (Fig. 1). After annotation, the COCO¹⁴ structured JSON¹⁵ files containing the bounding boxes and labels were downloaded and subjected to further validation steps.

Data Records

The number of images, annotations per bacterial species, and the distribution of the number of annotations per image are summarized in Fig. 2. The curated 369 digital images of 24 bacterial species cultures are freely available in the Figshare repository¹⁶. The filenames describe their origin. The first member of the file name is the bacterial species identifier (the ID column in Table 1), and the second member is the serial number of the image associated with that species. Accordingly, the naming file sp21_img04.jpg is the 4th image of the *Staphylococcus aureus* cultures. In addition to the images, the repository¹⁶ contains one metadata and five annotation files. In the first sheet of the images.xls metadata file, one line for a digital image contains the bacterial species ID, the file name, whether it was taken on a white or black background, and how many CFUs it contains. All the technical characteristics of the images and their recording are listed on the second sheet. The annot_COCO.json, annot_tab.csv, annot_tab.tsv, annot_VOC_XML.zip and annot_YOLO.zip files contain the 56,865 annotation data in COCO JSON, comma-separated, tab-separated, Pascal VOC XML¹⁷ and YOLO¹⁸ formats respectively.

Technical Validation

The annotated images of the bacterial cultures were curated by two experts with PhDs in bacteriology, and images they considered inappropriate were excluded from the final collection. The criteria for retaining images was whether the bacterial colonies morphologically matched the criteria for the species completely.

The annotations exported from the COCO annotator were reviewed by another expert using the Make Sense v1.11.0-alpha (<https://github.com/jsbroks/coco-annotator/>) tool, and the necessary corrections were made. In

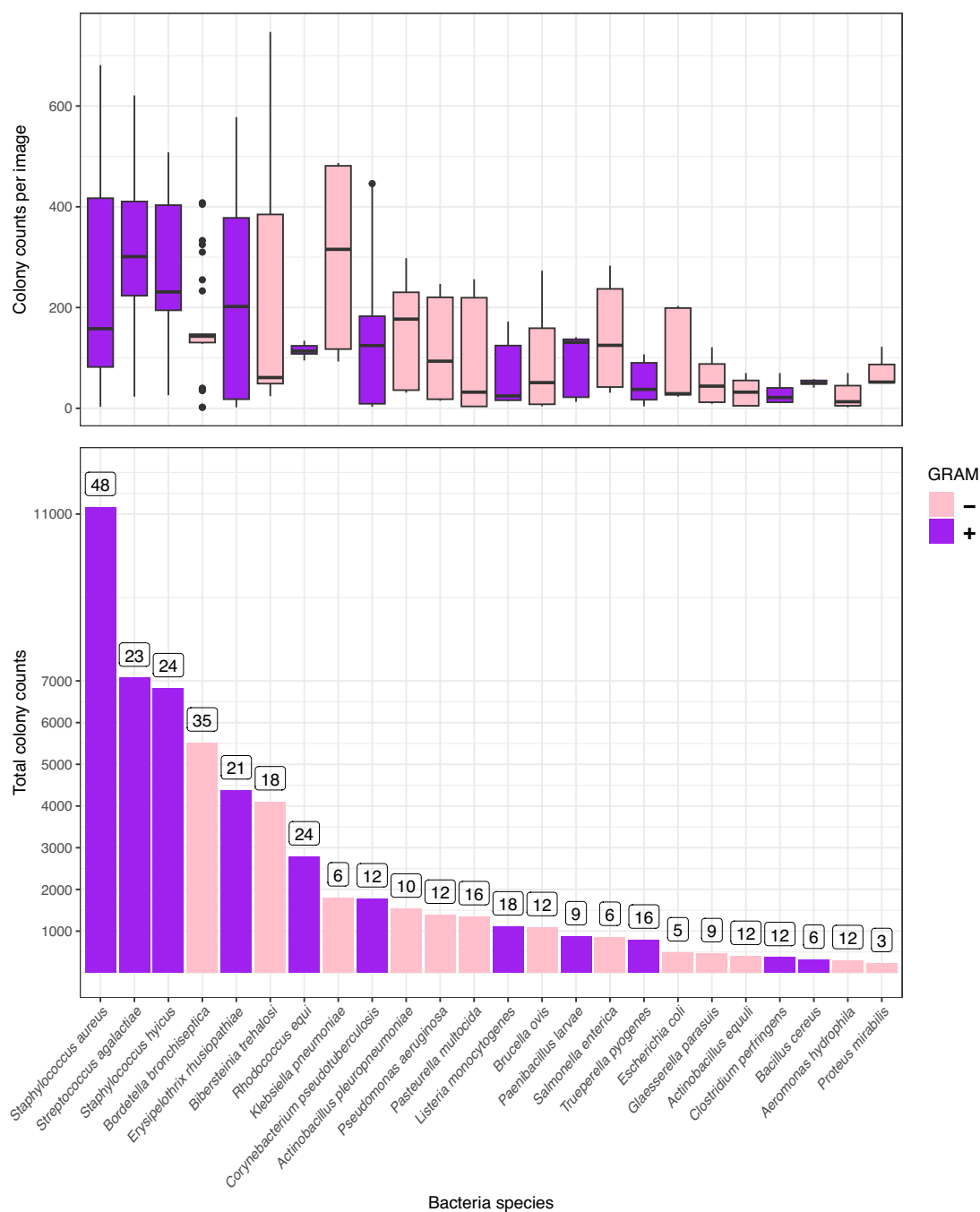


Fig. 2 Distribution of colony counts by species and images. The barplots represent the total number of annotated colonies by species and the number of images belonging to the species in the dataset above the bars. The boxplots summarize the distribution of the annotations per image. The coloring of the graph shows the Gram-staining of the bacterial species.

some cases, two identical images of the same culture were included in the initial collection, and these redundancies were filtered by findimagedupes v2.19.1 (<https://gitlab.com/opennota/findimagedupes>).

As our previous experience has shown that annotation bounding boxes exported from some annotation software can shift, especially for large numbers of annotated objects, we checked these separately. Since our CNN training designed on the dataset will be performed in the Detectron2 (<https://github.com/facebookresearch/detectron2>)

environment, we tested whether the position of the annotation bounding boxes on the images placed with Detectron2 is correct based on the COCO format JSON files generated from the CSV files exported from Make Sense. This was done using a Python script that placed the associated bounding boxes on each digital image. The resulting images were curated one by one, and in all cases, the annotation bounding box positions were found to be correct.

Further technical validation was performed using independent data. Bär *et al.*¹⁹ recorded images of *S. aureus* cultures every 10 minutes to estimate the colony growth rate. For this object detection challenge, not only the accuracy of colony detection but also the error of colony size estimation is also an important model selection criterion. We performed colony predictions on their publicly available images using CNNs trained on our dataset¹⁰. The colony growth rate presented by Bär *et al.*¹⁹ and our predicted colony growth rate showed a difference of 0.1 $\mu\text{m/h}$ (~0.2%).

Usage Notes

As we have more experience in object detection and classification with Detectron2, we recommend this environment for using the data. As several other efficient solutions are available, we have placed the annotation data in the repository¹⁶ in various formats to facilitate wider use of the data.

We believe the dataset can be used for three types of object detection and classification tasks. The first option is to train neural networks to detect bacterial colonies separately per species. A second option is to treat colonies of 24 species with different morphologies as one class and train CNNs on the whole dataset to detect a “general colony-forming unit” type¹⁰. A third option is to train the CNN on all the bacterial culture images and annotations but using the 24 classes, allowing the classification of bacterial colonies in addition to detection.

Code availability

As mentioned above, the correct position of the annotations was verified by drawing the corresponding bounding boxes on the images using Detectron2. The Python script used for this is in the file `bbox_placement_test.py`. The input annotation file for this run is a COCO JSON one. This was also generated from the tab-delimited annotation file using a Python script provided in `TSV_to_COCO.py`. Both script files are available in the Figshare repository¹⁶.

Received: 18 May 2023; Accepted: 21 July 2023;

Published online: 28 July 2023

References

- McVey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. M. & Wilkes, R. *Veterinary Microbiology* 4th edn (John Wiley & Sons, 2022)
- Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M. & Huber, W. EBImage—an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics* **26**, 979–981, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq046> (2010).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089> (2012).
- Geissmann, Q. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PLoS ONE* **8**, e54072, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054072> (2013).
- Torelli, A. *et al.* AutoCellSeg: robust automatic colony forming unit (CFU)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques. *Scientific Reports* **8**, 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24916-9> (2018).
- Zhang, L. Machine learning for enumeration of cell colony forming units. *Visual Computing for Industry, Biomedicine, and Art* **5**, 1–8, <https://doi.org/10.1186/s42492-022-00122-3> (2022).
- Ribli, D., Horváth, A., Unger, Z., Pollner, P. & Csabai, I. Detecting and classifying lesions in mammograms with deep learning. *Scientific Reports* **8**, 4165, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22437-z> (2018).
- Kilim, O. *et al.* Physical imaging parameter variation drives domain shift. *Scientific Reports* **12**, 21302, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23990-4> (2022).
- Nagy, S. Á., Kilim, O., Csabai, I., Gábor, G. & Solymosi, N. Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction. *Animals* **13**, 194, <https://doi.org/10.3390/ani13020194> (2023).
- Nagy, S. Á. *et al.* Bacterial colony size growth estimation by deep learning. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.04.25.538361> (2023).
- Ferrari, A., Lombardi, S. & Signoroni, A. Bacterial colony counting with convolutional neural networks in digital microbiology imaging. *Pattern Recognition* **61**, 629–640, <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2016.07.016> (2017).
- Huang, L. & Wu, T. Novel neural network application for bacterial colony classification. *Theoretical Biology and Medical Modelling* **15**, 1–16, <https://doi.org/10.1186/s12976-018-0093-x> (2018).
- Beznik, T., Smyth, P., de Lannoy, G. & Lee, J. A. Deep learning to detect bacterial colonies for the production of vaccines. *Neurocomputing* **470**, 427–431, <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2021.04.130> (2022).
- Lin, T.-Y. *et al.* Microsoft COCO: Common objects in context. In *European conference on computer vision*, 740–755, https://doi.org/10.1007/978-3-319-10602-1_48 (Springer, 2014).
- Pezoa, F., Reutter, J. L., Suarez, F., Ugarte, M. & Vrgoč, D. Foundations of JSON schema. In *Proceedings of the 25th international conference on World Wide Web*, 263–273, <https://doi.org/10.1145/2872427.2883029> (2016).
- Makrai, L. *et al.* Annotated dataset for deep-learning-based bacterial colony detection. Figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22022540.v3> (2023).
- Everingham, M. *et al.* The PASCAL visual object classes challenge: A retrospective. *International Journal of Computer Vision* **111**, 98–136, <https://doi.org/10.1007/s11263-014-0733-5> (2015).
- Redmon, J., Divvala, S., Girshick, R. & Farhadi, A. You Only Look Once: Unified, Real-Time Object Detection. Preprint at <https://doi.org/10.48550/arXiv.1506.02640> (2016).
- Bär, J., Boumasoud, M., Kouyos, R. D., Zinkernagel, A. S. & Vulin, C. Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Scientific Reports* **10**, 16084, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72979-4> (2020).

Acknowledgements

This work has been supported by the European Union project RRF-2.3.1-21-2022-00004 within the MILAB Artificial Intelligence National Laboratory framework.

Author contributions

N.S. takes responsibility for the data's integrity. N.S., L.M., G.S. and I.C. conceived the concept of the work. L.M., B.F. and P.C. performed the bacteria culturing. B.F. and P.C. made the digital images. B.F. and S.Á.N. annotated the images. L.M. and G.S. curated the digital images. N.S. curated and edited the annotations. N.S., S.Á.N., B.F. and L.M. participated in the drafting of the manuscript. N.S., S.Á.N., L.M., G.S. and I.C. carried out the manuscript's critical revision for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Veterinary Medicine.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Artificial neural networks in the animal production sector

S. Á. Nagy¹
I. Csabai²
T. Varga³
B. Póth-Szebenyi⁴
Gy. Gábor⁵
N. Solymosi^{1*}

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Bioinformatikai Központ, H-1078
Budapest István u. 2.

*e-mail: solymosi.norbert@gmail.com

2. ELTE Komplex Rendszerek Fizikája
Tanszék, Budapest

3. SZIMBIÓVET Kft., Egyházaskövesd

4. Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem, Kaposvári Campus,
Kaposvár

5. Androvet Kft., Budapest

Mesterséges neurális hálózatok az állattermék-előállításban

Nagy Sára Ágnes¹, Csabai István², Varga Tamás³, Póth-Szebenyi Bettina⁴,
Gábor György⁵, Solymosi Norbert^{1*}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők bemutatják a mesterséges intelligencia használatának lehetőségeit, amelynek a térnyerése az agráriumban sem kerül el. A mesterséges neurális hálózat az agráriumbeli gépi tanulási módszerek között a leghatékonyabb gépi tanulási eszköz. Az mesterséges neurális hálózatok bonyolult matematikai modellek, amelyek betaníthatók az adatokban (pl. képekben) rejlő mintázatok (pl. állati testrészek) felismerésére. A tanítást követően pedig e mintázatok predikciójára használhatók. Jelen közleményünkben a szerzők összefoglalják az mesterséges neurális hálózat általános szerkezetét és működését. Bemutatnak továbbá felhasználási lehetőségeket kifejezetten az állattermék-előállítás területéről vett példákon keresztül.

SUMMARY

The rise of artificial intelligence (AI) is not going unnoticed in the agricultural sector. The processing of the large amounts of data ('big data') generated in animal production is increasingly being done using artificial intelligence, particularly machine learning (ML). Machine learning is a branch of AI, in which algorithms are automatically trained to solve a task of interest using a given dataset. There are several sub-areas of ML, of which we focus on artificial neural networks (ANNs), the most successfully used in agriculture. The basic units of an ANN are artificial neurons. These are connected to each other similarly to synapses in the brain, forming a network. ANNs can be considered complex mathematical models that can make predictions from given data after a learning process, taking into account millions of parameters. Because they are pretty flexible, these networks have a wide range of applications in many fields. One such field is a subset of agriculture, namely animal production. In our work, we outline the general structure and operation of ANNs. We provide insight into the metrics widely used to indicate the accuracy of prediction and their calculation methods. Possible applications are illustrated with examples specifically from the field of food production. The wide range of applications is illustrated by the fact that the works cited also respond to the challenges faced by aquacultures and beekeepers, in addition to the problems of cattle, pig and poultry farms. Despite their many good features, ANNs cannot solve all problems, regardless of type. Therefore, in our work we also concern about the limitations of the method. Our work contributes to the definition of artificial intelligence, machine learning, and artificial neural networks in the context of agriculture.

Széleskörűen elfogadott tény, hogy az emberiség növekvő populációja, a növekvő minőségi igények, a klimatikus viszonyok megváltozása világszerte egyre nagyobb terhet rónak a mezőgazdaságra [1]. A piac felől érkező, folyamatosan változó minőségi és mennyiségi igények miatt az agrárium is változásra kényszerül. Napjainkban precíziós mezőgazdaság nélkül elképzelhetetlen a költséghatékonyság fokozása és a környezeti terhelés csökkentése nagyüzemi szinten. A precíziós növénytermesztés és állattartás során nagy mennyiségű adat („big data”) keletkezik, aminek használható információvá alakításában [2] egyre gyakrabban használjuk a mesterséges intelligencia (artificial intelligence, AI) eszköztárát [3].

Precíziós módszerek nélkül elképzelhetetlen a költséghatékonyság fokozása és a környezeti terhelés csökkentése az agráriumban

A gépi tanulási módszerek közül a mesterséges neurális hálózatok a leghatékonyabbak az agrártudományi kutatásokban

Annotáció során osztályba sorolt adatok jelentik a bemeneti adathalmazt

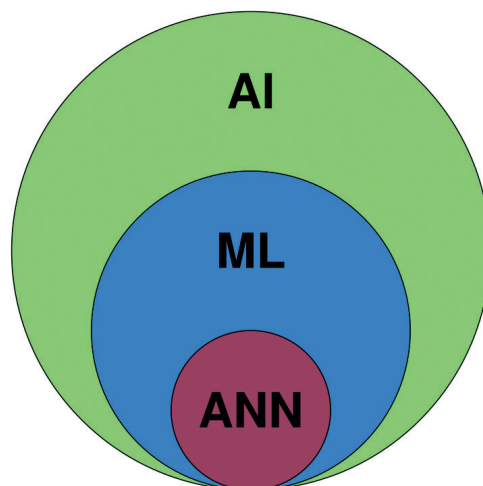
A gépi tanulás (machine learning, ML) az AI egyik részterülete, aminek általános sajátossága, hogy az összegyűjtött adatok felhasználásával, algoritmusokat tanítunk be abból a célból, hogy a számunkra fontos információt automatizáltan prediktálhassuk [1, 4]. BENOS és mtsai 2021-es tanulmányából kiderül, hogy a gépi tanulás alkalmazhatósága az agráriumot tekintve a növénytermesztésen belül a legkutatottabb (68%), ezt követi az állattenyésztés (12%), majd a víz- és talajgazdálkodás (10–10%). Az állattermék-előállításához kapcsolódó gépi tanulás használhatóságát vizsgáló tanulmányok aránya a következőképpen alakult állatfajonként: szarvasmarha (58,5%), juh és kecske (26,8%), sertés (14,6%), baromfi (4,9%) és juhászkutya (2,4%) [1]. Az állattartásban használatos gépi tanulási algoritmusokat két csoportba oszthatjuk: állattartási és termelékenységi elemzések (1. ábra).

Jelenleg a szakirodalomban az utóbbira vonatkozó találatok vannak túlsúlyban. A gépi tanulásnak számos válfaja létezik (pl. regressziós, random forest, k-legközelebbi szomszéd), az ezekben használt modellek alkalmazhatósága is céltól függően változó. A megoldani kívánt feladat és a rendelkezésre álló adatbázis tulajdonságainak fényében lehet a megfelelő modelleket kiválasztani [5]. BENOS és mtsainak irodalmi áttekintése alapján a gépi tanulási módszerek közül a mesterséges neurális hálózatok (artificial neural networks, ANN) a leghatékonyabbak az agrártudományi kutatásokban.

A továbbiakban az ANN-ek általános ismertetését, ill. azokra vonatkozó példákat mutatunk be. Munkánkban betekintést nyújtunk a gépi tanulás főbb jel-

1. ÁBRA. A mesterséges neurális hálózat (artificial neural network, ANN) az agráriumbeli mesterséges intelligencia (artificial intelligence, AI) alkalmazások között a leghatékonyabb gépi tanulási (machine learning, ML) eszköz

FIGURE 1. The artificial neural network (ANN) is the most effective machine learning (ML) tool among the artificial intelligence (AI) applications in agriculture



lemzőibe, alkalmazhatóságába. Tisztázzuk a gépi tanulás és a neurális hálók viszonyrendszerét. Áttekintjük az ANN alapvető felépítését és működését példákon keresztül, valamint a neurális hálók predikciós képességének értékelésével is foglalkozunk. Végül az ANN állatitermék-előállításban való használhatóságára mutatunk be példákat. Munkánk célja betekintést adni a gépi tanulási modellek, legfőképpen az ANN-ek állatitermék-előállításban való felhasználásáról.

GÉPI TANULÁS MESTERSÉGES NEURÁLIS HÁLÓZATOKKAL

A gépi tanulás olyan algoritmusokkal foglalkozik, amelyek képesek mintázatok felismerésére

A gépi tanulás a mesterséges intelligencia azon területe, amely olyan algoritmusokkal foglalkozik, amelyek képesek – az emberhez hasonlóan – mintázatok felismerésére [6]. Ezek olyan algoritmusok, amelyek képesek korábbi „tapasztalatok” felhasználásával egy adott feladat megoldására [1], anélkül, hogy direkt módon a probléma megoldására lennének programozva [5, 7]. Ahhoz, hogy egy már megalkotott általános gépi tanulási modell az általunk megoldani kívánt feladatra adjon választ, „tanítani” kell. A tanítási módszerek alapvetően két csoportba oszthatók: felügyelt (supervised) és nem felügyelt (unsupervised). Az előbbi esetén a tanítás során az algoritmus felhasználja a megfigyelt kimeneteket, míg az utóbbi nem. Alkalmazás szerint is több alaptípus létezik, pl. osztályba sorolás, objektumdetektálás, keypoint-detektálás. Változatos problémákon való alkalmazhatóságuknak és azon tulajdonságuknak köszönhetően, hogy sikeresen lehet nagy elemszámú és komplex adathalmazokon is használni, számos tudományterületen egyre elterjedtebb a gépi tanulási modellek használata [6].

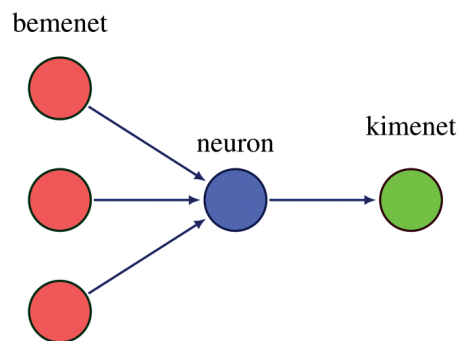
A gépi tanulás folyamatának általános mozzanatait egy olyan osztálybasorolási példán keresztül mutatjuk be, amely felügyelt tanítást alkalmaz. Tegyük fel, hogy be szeretnénk tanítani egy algoritmust arra, hogy digitális fényképekről eldöntse, hogy mit ábrázolnak. Erre példa MACHUVE és mtsainak munkája, amelyben egy olyan megoldást fejlesztettek Tanzániában, aminek segítségével a gazdák baromfiürülékről készült digitális fénykép alapján korai információhoz juthatnak az állatok megbetegedésére vonatkozóan [8]. Felügyelt tanítás esetén a bementi adathalmazunk olyan adatokból áll, amihez hozzárendelünk egy címkét arra vonatkozóan, hogy milyen osztályba (ground truth) tartoznak [6]. Ez az ún. annotáció (annotation, labeling). Jelen esetben az annotálás azt jelenti, hogy van egy több mint 8000 db, keresztezett és őshonos tojóttyúk ürelékéről készült digitális fényképből álló adathalmaz, aminek minden egyes elemét „ba-

2. ÁBRA. Egy neuron információátadási sémája

Ha az idegsejtbe érkező bemeneti jelek összegződésének eredménye meghalad egy adott határértéket, akkor kimeneti jel keletkezik. Ha nem haladja meg a határértéket, akkor elnyelődik, nem jut tovább a jel

FIGURE 2. The information propagation scheme of a neuron

When the sum of the input signals to the neuron exceeds a certain threshold, an output signal is produced. If it does not exceed the threshold, it is swallowed and the signal is not passed on



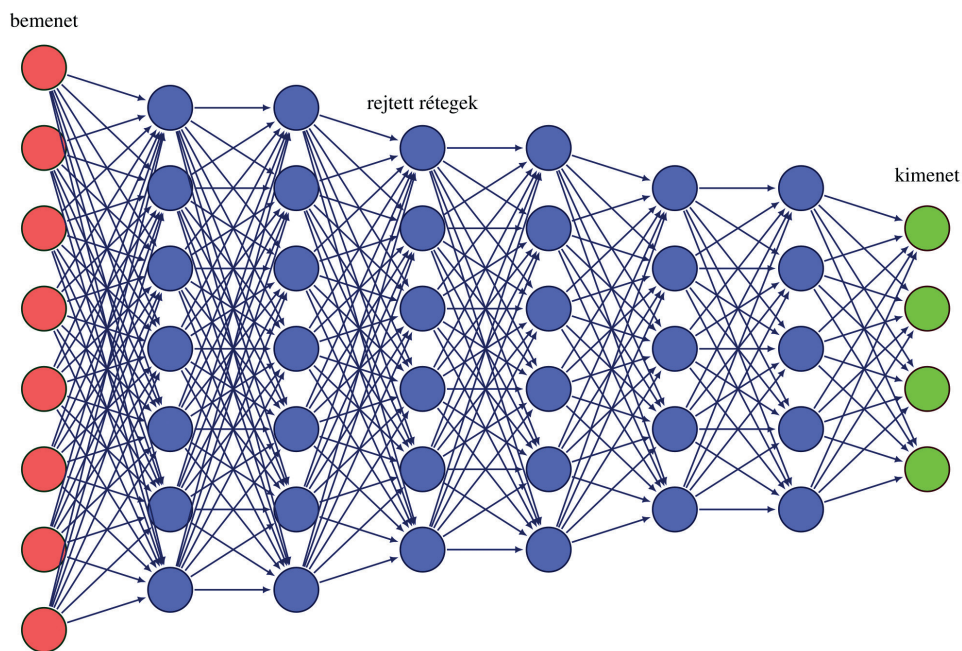
Az annotáció mellett a megfelelő gépi tanulási modell kiválasztása is kulcsfontosságú lépés

A mesterséges neurális hálózatok alapötletét az idegsejtek információfeldolgozási, -továbbítási modellje adta

romfipestis”, „kokcidiózis”, „szalmonellózis” vagy „egészséges” címkével látták el a kutatók PCR-vizsgálatokra és szakértői makroszkópos véleményre alapozva.

A bementi adathalmazunk megalkotása mellett, a megfelelő gépi tanulási modell kiválasztása az egyik kulcsfontosságú mozzanat, ami a hatékonyságot befolyásolja [5]. MACHUVE és mtsai vizsgálatukban öt különböző ANN-t tanítottak be a tojóttyúkocok ürülékéről készült képek osztályba sorolására. A továbbiakban áttekintjük a neurális hálóok általános szerkezetét és működését [8].

Az első ANN-ek fejlesztésének, alkalmazásának alapötletét az idegsejtek információfeldolgozási, -továbbítási modellje adta [9, 10]. Ezek olyan matematikai modellek, amelyek az agy felépítéséhez hasonló szerkezettel bírnak [6]. Az agyhoz hasonlóan a neurális hálóok működését biztosító alapegységek is a neuronok. A rendszer legegyszerűbb sémája az, hogy egy idegsejtbe jelek érkezik és azokat a sejt valamilyen szabályrendszer alapján továbbítja (vagy sem) a másik idegsejt felé (2. ábra). Ez egy mesterséges neuron esetében azt jelenti, hogy



3. ÁBRA. Mély neurális hálózat

A bemeneti és kimeneti rétegek között, ún. rejtett rétegekbe rendezetten nagyszámú neuron helyezkedik el. A hálózat teljesen összekötött, mivel minden réteg minden eleme minden szomszédos réteg összes elemével kapcsolatban áll. A rejtett rétegek, ill. a bemeneti és kimeneti rétegek elemeinek száma a modellezési feladatnak megfelelően változik. A példánkban a bemeneti rétegben minden piros korong az ürülékéről készült kép egy pixelét jelzi, míg a kimenet a négy lehetséges osztályt

FIGURE 3. Deep neural network

A large number of neurons are arranged in hidden layers between the input and output layers. The network is fully connected, as each element of each layer is connected to all elements of all neighbouring layers. The number of hidden layers, or the elements of input and output layers, varies according to the modelling task. In our example, each red circle in the input layer represents one pixel of the image of the feces, while the output represents the four possible classes



4. ÁBRA A gépi tanulás folyamatának sémája

A tanuló adathalmazon az algoritmus a hálózat neuronjainak paramétereit (súlyok) iteratív módon úgy változtatja, hogy a kézi annotáció és a predikció eltérését minimalizálja. Meghatározott számú iterációnként a validációs halmazon is predikciót végzünk, aminek eredményét szintén összevetjük a kézi annotációval

FIGURE 4. Schema of the machine learning process

On a learning dataset, the algorithm iteratively changes the parameters (weights) of the network neurons to minimize the deviation between manual annotation and prediction. For a given number of iterations, prediction is also performed on the validation set, the result of which is also compared with the manual annotation

A tanítóhalmaz alapján a rendszer prediktálja a validációs halmaz eredményeit

A validációs halmazon végzett előrejelzések eredménye alapján lehet kiválasztani a legjobb eredményt adó algoritmusokat

ő maga egy olyan függvény, ami egy, de inkább több bemeneti értéket (input) kimeneti értéké (output) alakít [11].

A gépi tanulásban alkalmazott neurális hálózatok ebből az egyszerű egységből kiindulva egy, de inkább több rétegbe rendezett nagyszámú neuronból állnak (3. ábra). Az egyik réteg neuronjainak outputjai lesznek a következő réteg inputjai [6]. A szomszédos rétegek elemei között lehet teljes vagy részleges az összekötöttség. A nagyszámú neuronrétegből álló hálózatokat mély hálózatoknak is nevezzük, az ezekre épülő gépi tanulást pedig mély tanulásnak (deep learning). Ahogy az inger hatására az ingerület végighalad az idegsejteken, úgy halad a kezdeti bemeneti érték neuronról neuronra az ANN szerkezetén.

Az ANN tanítását megelőzően az annotált képeket két csoportba osztjuk, a nagyobb részük (pl. 80%-a) alkotja a tanítóhalmazt (train set), a kisebb részük (20%) pedig az ún. validációs halmazt (validation set). A tanítás első lépésében az ANN minden neuronja kap egy véletlen vagy nem véletlen (pl. előtanításból származó) kezdeti paramétert (ún. súlyokat). Az input adatok (jelen esetben egy kép) belépnek az ANN-be és jelek formájában végighaladnak a neuronokon, aminek az eredménye a hálózat végén a kimenet. A példánkban a kimenet azt jelenti, hogy egy képhez négy valószínűséget rendel, legyen mondjuk az „egészséges” osztályba tartozás valószínűsége 87%, a „szalmonellózis” osztályba tartozásé 45%, a „kokcidiózisé” 28%, míg a „baromfipestisé” 9%. Ezek alapján az adott kép esetén a legnagyobb valószínűsége annak van, hogy egészséges állat ürülékét ábrázolja, így ebbe az osztályba lesz besorolva, ez lesz a végső kimeneti érték. Az így létrehozott predikciókat összehasonlítja a szakértői annotációval, és az eltéréseket csökkentendő, módosítja a neuronok súlyait. Majd a módosított súlyokkal újra prediktált osztályt a képekhez, amit megint összevet a kézi annotációval. Meghatározott számú ismétlésenként (iterációnként) az algoritmus a validációs halmaz képeit használva is készít predikciót (4. ábra).

A validációs halmazon végzett előrejelzések eredménye és a szakértői annotáció közötti különbség adja az ún. predikciós hibát, ami a modell osztályozási képességéről nyújt információt. Mivel a folyamat során minden egyes iterációval megváltoznak a paraméterek, meghatározott számú iterációnként eltárolják az ANN-hez tartozó összes paramétert és azt, hogy mekkora az eltérés a szakértői és a prediktált osztályok között. Így a tanítás befejeztével a legkisebb hibát adó paramétergyűjtemény lesz a munka eredménye, amely később felhasználható hasonló digitális fényképek osztályozására. A bemutatott példában tanító és va-

lidációs halmazokat használtunk, azonban számos esetben alkalmaznak ezen túl egy független teszhalmazt is [12]. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy az ANN predikciós megbízhatóságára, általánosíthatóságára vonatkozóan megalapozottabb képet kaphassunk.

A PREDIKCIÓ MINŐSÉGÉNEK ÉRTÉKELÉSE

A mesterséges neurális hálózatok besorolási hibáját minden esetben ismernünk kell

Az előzőekben láthattuk, hogy egy adott képhez azt az osztályt rendeljük végül a neurális hálózat, amelynek a legnagyobb a valószínűsége. Azonban ez természetesen nem hibátlan predikció, vagyis mindig előfordulnak hibás besorolások. A gépi tanulási algoritmusok, így a mesterséges neurális hálózatok besorolási hibáját minden esetben ismernünk kell annak érdekében, hogy a használhatóságát értékelni tudjuk. A következőkben összefoglaljuk a szakirodalomban használt, a besorolási hibát számszerűsítő mértékeket, először kettő, majd több osztályra vonatkozóan. Mindkét helyzetben ún. kontingenciatáblázatban foglaljuk össze a szakértői és a prediktált osztályok egyezőségét, eltérését.

A két osztályra vonatkozó predikciós pontosság becslését Mao és mtsai munkáján keresztül mutatjuk be [13]. Ők ANN-eket tanítottak be arra, hogy elkülönítsék brojlercsirkék stresszjelző hangmintázatát a semleges istállózajoktól. Itt tehát két osztályt használtak: a stresszt és nem-stresszt jelző hangokat. Ebben az esetben a kontingenciatáblázat egy kétszer-kettes mátrix (*Táblázat*), aminek a cellái a következők. A valódi negatív predikciók (true negative, TN) cellája tartalmazza azoknak a hangoknak a számát, amelyeknek a szakértői osztályozása és a neurális hálózat alapján prediktált osztálya is az istállózaj volt. A valódi pozitív predikciók (true positive, TP) cellája tartalmazza azoknak a hangoknak a számát, amelyeknek a szakértői osztályozása és a neurális hálózat alapján prediktált osztálya is a stresszjelzés volt. A téves negatív predikciók (false negative, FN) cellája azoknak a hangoknak a számát tartalmazza, amelyek a szakértői osztályozás alapján stresszjelzések voltak, de a neurális hálózat istállózajként klasszifikálta. A téves pozitív predikciók (false positive, FP) cellája azoknak a hangoknak a számát tartalmazza, amelyek a szakértői osztályozás alapján istállózajok voltak, de a neurális hálózat stresszjelzésnek azonosította.

A kontingenciatáblázatból számolhatunk számos mértéket, amellyel jellemezhető a betanított neurális hálózatunk predikciós megbízhatósága. Ilyen az ac-

A kontingenciatáblázat foglalja össze a szakértői és a prediktált osztályok egyezőségét, eltérését

TÁBLÁZAT. Mao és mtsai közleményéből becsülhető kontingenciatáblázat [13]

A cellák értékei a szakértői és a prediktált osztályok egyezőségét, eltérését számszerűsítik. Az FN a téves negatív, az FP a téves pozitív, a TN a valódi negatív, a TP a valódi pozitív predikciók száma. Ezek alapján a predikció minőségét összegző értékek: accuracy = 0,957, Cohen-féle kappa = 0,908, F1 score = 0,943, precision = 0,927, recall = 0,959

TABLE Contingency table estimated from Mao et al. [13]

The values in the cells quantify the agreement or disagreement between the expert and predicted classes. FN is the number of false negatives, FP is the number of false positives, TN is the number of true negatives, and TP is the number of true positives predicted. Based on these, the values summarising the quality of prediction are: accuracy=0.957, Cohen's kappa=0.908, F1 score=0.943, precision=0.927, recall=0.959

Szakértői osztályozás	Predikció		Összesen
	Istállózaj	Stresszjelzés	
Istállózaj	TN = 643	FP = 30	673
Stresszjelzés	FN = 16	TP = 379	395
Összesen	659	409	1068

$accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$, az $F1\ score = 2 \times TP / (2 \times TP + FP + FN)$, a $precision = TP / (TP + FP)$, ill. a $recall = TP / (TP + FN)$, ami megegyezik a szenzitív-tás/érzékenység (sensitivity, Se) és valós pozitívítási arány/true positive rate (TPR) metrikákkal. Szintén gyakran használt mérték a Cohen-féle kappas = $(accuracy - random\ accuracy) / (1 - random\ accuracy)$, ahol a random accuracy = $p1 \times p2 + (1 - p1) \times (1 - p2)$, továbbá $p1 = (TP + FN) / (TP + FP + TN + FN)$ és $p2 = (TP + FP) / (TP + FP + TN + FN)$. Mindegyik metrika értéke 0 és 1 között változhat, minél közelebb van az egyhez, annál jobb predikciót jelez.

Mivel a bemutatott mértékek két osztály esetén kalkulálhatók, ha ennél több osztályra vonatkozóan becsüljük a predikció minőségét, akkor az ún. egy az összes ellen (one-versus-all) megközelítést használjuk. Ez azt jelenti, hogy minden osztály esetén kiszámoljuk, hogy hány predikció esett az osztályba (ezek lesznek a TP és FP értékek), ill. hogy összesen hány esett a többi osztályba (TN és FN). Így mindegyik osztályra külön-külön becsülhetünk minőségi mértékeket. Előfordul, hogy az összes osztályra vonatkozóan megadják ezen minőségi metrikák átlagát is, mint teljes predikciós minőségi becslést.

Folytonos változókon alkalmazott predikciók esetén a bemutatott osztálybatorolási minőségi mértékek helyett a megfigyelt és prediktált értékek különbségét felhasználva fejezzük ki a modell pontosságát. Ilyen gyakrabban használt mérték az MSE (mean square error of prediction) vagy az RMSE (root mean square error of prediction). Minél kisebb az értékük, annál pontosabb a predikció.

A megfigyelt és a prediktált értékek különbségét felhasználva fejezhető ki a modell pontosságát

PÉLDÁK MESTERSÉGES NEURÁLIS HÁLÓZATOK ALKALMAZHATÓSÁGÁRA

Az eddig leírt tulajdonságokból adódóan, az ANN számos tudományterületen alkalmazható számtalan probléma megoldására. A következőkben egy-egy példával szemléltetjük a neurális hálók sokrétű használhatóságát az állatiternék-előállítás folyamata során. E folyamat első mozzanatai közé tartozik a takarmányelőállítás, ehhez kapcsolódóan Naoy és mtsai lucernaszenázs-min-tákban detektáltak antimikrobiális rezisztenciagéneket (ARG) [14]. Az ARG-ket tartalmazó DNS-szekvenciák plazmideredetét ANN felhasználásával prediktálták. Ugyanezt a megközelítést alkalmazták állati termékekben, így nyerstejben [15], probiotikus élelmiszerekben [16] és étrend-kiegészítőkből [17] azonosított ARG-k mobilitásának vizsgálatában.

Annak ellenére, hogy a mézelő méhek extenzíven tartott haszonállatok, a méztermeléshez kapcsolódóan számos ML-alkalmazás születik. PAOLILLO és mtsai mézelő méhek kaptár-higiéniai viselkedésének digitális felvételeken történő megfigyelésére használtak ANN-t [18]. BILIK és mtsai méhek *Varroa destructor* atka fertőzöttségének detekciójában alkalmaztak neurális hálókat [19]. ALVES és mtsai mély tanuláson alapuló szoftvert fejlesztettek, amely a lépsejtek hét típusát tudja automatizáltan elkülöníteni [20]. RACHINENI és mtsai nádcukorból készült sziruppal, barnarizssziruppal és kukoricasziruppal hamisított mézeket vizsgáltak mágneses magrezonancia spektroszkópia segítségével [21]. Az alkalmazott gépi tanulási eljárások – köztük az ANN – is alkalmasnak bizonyultak e szirupok mézben való felderítésére.

Az extenzívnek mondható méhtartással szemben, a tejelő szarvasmarhatartás folyamatainak gépesítése már a 19. század vége óta elindult [22]. Az első fejőgép megjelenését számtalan gép követte a tejtermelésben, ami manapság tejelő tehenészetekben növeli az automatizáció mértékét, segít az érzékelésben. Az érzékelők bővülő köre és mindennapi használata lehetőséget biztosít gépi tanulási módszerek fejlesztésére és használatára [23]. Mesterséges neurális hálót használva tettek már kísérletet a sántaság automatikus felismerésére [24, 25], az aktivitás monitorozásán alapuló ivarzásmegfigyelés javítására [26], valamint

Neurális hálózatokkal prediktálható egyes antimikrobiális rezisztenciagének plazmideredete

Mesterséges neurális hálót fejlesztettek már sántaság- és ivarzásmegfigyelésre, ill. kondíciópontozásra is szarvasmarhában

A sertés- és baromfitartásban, valamint az élelmiszerbiztonság területén is fejlesztettek már neurális hálózatokon alapuló rendszereket

a kondíciópontozás (body condition score, BCS) gépesítésére is [12, 27, 28]. Egy magyarországi tehenészetben készült vizsgálatban az ANN predikciós képességét határozták meg különböző BCS-skálák esetében. Továbbá az is a vizsgálat tárgyát képezte, hogy a pontozáshoz figyelembe vett terület mérete, hogyan befolyásolja a predikciót. Kutatásuk során sikerült olyan beállítást alkalmazni, amellyel közepes/erős predikcióhoz juthatunk ANN segítségével [12].

A tehenészeti telepeken jellemző gépesítettséget is meghaladja az intenzív és félintenzív akvakultúrák automatizáltsága. Ezek gazdaságos működése csak adatintenzív technológiákkal érhető el. Ehhez elengedhetetlen az innovatív és automatizált technikák kifejlesztése, használata [29]. Akvakultúrák esetében is számos lehetőség kínálkozik neurális hálók alkalmazására. ZHOU és mtsai kutatásukban négy csoportba soroltak halakat étvágyuk szerint ANN segítségével [30]. FERNANDES és mtsai olyan ANN-t hoztak létre, amely képes nílusi tilápiákat azonosítani, azok testtömegét és karkaszuk tömegét megbecsülni [31]. Liu és mtsai a vízben jelen lévő oldott oxigén mennyiségét jelezték előre ANN segítségével [32].

Az akvakultúrákhoz hasonlóan a sertéstartás bizonyos szegmenseiben a nagyfokú iparosodottság elkerülhetetlen, amely szintén automatizált munkafolyamatokon, adatelemzésen alapul [33]. ZHANG és mtsai 3D-s képek feldolgozásával olyan, teljesen automatikus rendszert hoztak létre, amely képes sertések testtömegét és testméreteit felmérni [34]. Az állatok termékekenységének vizsgálatán túl a takarmányra vonatkozó információkat is szerezhettünk neurális hálók segítségével [35]. BRÜNGER és mtsai arra tettek kísérletet, hogy vágóhídon készített fényképekre alapozva ANN segítségével automatizálni tudják a farokrágás jeleinek (0-tól 3-ig osztályozva, súlyosság szerint) felismerését a vágási folyamat során. Ezzel könnyítve meg az állatjóléti felmérések kivitelezését [36]. A viselkedés közvetlen vizsgálata is elérhető ANN segítségével. Videóelemzéssel lehetséges a sertések szociális viselkedésének értékelése, ezáltal pedig a viselkedés megváltozásának korai felismerése. WUTKE és mtsai modelljükkel képesek voltak videófelvételen szereplő sertéseket azonosítani, követni, és a szociális interakcióikat (fej-fej, fej-farok kontaktus) azonosítani [37]. A takarmány- és vízfelvétel vizsgálata szintén elvégezhető ANN-re alapozott videóelemzéssel. KIM és mtsai választás utáni malacok takarmány- és vízfelvételi szokásait vizsgálták. Tanulmányukban arra jutottak, hogy a modell a jövőben alkalmas lehet a választás utáni kritikus időszakban a malacok takarmányfelvételét követni, amivel hozzájárul a takarmányozás javulásához [38].

A baromfitartás során szintén számos lehetőség van ANN-k használatára. LI és mtsai naposcsibék hang alapján történő szexálását vizsgálta sikeresen labor körülmények között. Három különböző baromfifaj naposcsibéinek hangját elemezve a neurális háló különbséget tudott tenni a kakasok és a tojók között [39]. Léteznek olyan neurális hálók, amelyek képesek brojlercsirkék gyarapodási görbéjét [40], vagy akár tojótyúk tojástermelési görbéjét [41] prediktálni. A viselkedés monitorozására szintén alkalmazható módszernek bizonyult a ANN brojlercsirkék esetében. A csirkéket 1–50 napos koruk között vizsgálva ANN segítségével automatikusan osztályozni tudták a viselkedésük alapján őket négy kategóriába (evés, ivás, állás, pihenés) [42].

A gépi tanulás alkalmazhatósága az állattermék-előállításban nem csak a szűken vett állattartásban jelenik meg. Számtalan példa létezik az élelmiszerlánc későbbi pontjain is ANN használatára növényi, állati és mikrobiális eredetű élelmiszerek vonatkozásában is [43, 44]. CORONEL-REYES és mtsai tyúktojások frissességét prediktálták sikeresen ANN segítségével közeli infravörös reflexiók (near infrared reflectance, NIR) mérések alapján [45]. Yu és mtsai szintén NIR technológiát alkalmaztak hiperspektrális képalkotással kiegészítve fehér garnélarakok bakteriális szennyezettségének felderítésére. A használt ANN-modell képes volt

nagy pontossággal prediktálni a garnélarákok szennyezettségét [46]. Mindkét módszer képes anélkül precíz eredményt adni, hogy a vizsgált élelmiszer minőségét rontaná, ami előnyös tulajdonság az élelmiszer-vizsgálatoknál.

MEGVITATÁS

Ahogy a bemutatott példákban látható, és a mesterséges intelligencia általános terjedése alapján várható, az állattermék-előállítás folyamatában egyre több ML-, ezen belül ANN-alkalmazás jelenik meg. Annak ellenére, hogy az ML-modellek képesek az adatokban rejlő minták azonosításán keresztül bonyolult feladatokra megoldást adni [47], számos hátulütőjük említhető. Ilyen az adatérzékenységük, ami kritikus pontja a hatékonyságuknak. Amikor a való életből származó adatokkal dolgozunk, a legkritikább esetben találkozunk jól dokumentált, jól struktúrált, kellő gyakorisággal és pontossággal, különböző forrásokból gyűjtött, sokféle és nagy mennyiségű adattal („big data”). Sokkal inkább a retrospektív adatgyűjtés a jellemző, amelynek sokszor velejárója a kétértelmű, hiányzó, kiugró értékeket és értelmetlen adatokat tartalmazó adatsorok [5]. Ezeket sok esetben rosszul kezelik az ML-modellek, ami a hatékonyság romlásában mutatkozik meg. A másik, hatékonyságot rontó körülmény az adott feladathoz nem megfelelő modell alkalmazása. Ezt úgy kerülik el, hogy több eltérő modellt próbálnak ki párhuzamosan, és a legkisebb hibát eredményező(ke)t tartják meg. Az ML általánosságban vett nehézségein túl, a mezőgazdaságban való alkalmazását számos egyéb, az agráriumra jellemző tényező is terheli. A gyakorlatban való felhasználást nehezíti az a körülmény, hogy az ML-rendszerek adatérzékenysége miatt a megfelelő adatgyűjtés általában nagyszámú érzékeny keresztül valósul meg. Ezek sokszor drágák, kezdetben jelentős befektetést igényelnek az állattartó, növénytermesztő részéről [48], amelyek gátat jelenthetnek a beszerzésüknek. Továbbá a termelés felügyeletére megvásárolt különböző gyártmányú érzékelők sokszor nem alkalmasak arra, hogy egy szabványosított adatinfrastruktúrát biztosítsanak az egyes gyártók különböző módszerei miatt [3]. Egy adott adathalmazon, környezetben betanított ANN kiterjeszhetősége változó. Ami azt jelenti, hogy egy adott állományban fejlesztett és jól prediktáló modell nem biztos, hogy máshol is ugyanolyan jól működik. Érdemes azonban rámutatni arra a lehetőségre, hogy egy betanított ANN neuronjaihoz tartozó súlyokat egy másik ANN-nek, azonos feladatra való tanítása során kezdeti paraméterként lehet használni. Így az új adatokon történő tanítás egy ún. előtanított ANN-ből indul ki. Ez azzal jár, hogy az ilyen módon végzett adaptálás kevesebb új tanító adatot igényel. Ezt felismerve nem kivételes az, hogy a területen dolgozó kutatók az általuk létrehozott súlyokat közzéteszik, ezáltal mások fejlesztéseit megkönnyítve [12]. A korlátait figyelembe véve a gépi tanulás és azon belül a mesterséges neurális hálóak a mezőgazdaságban hatékony eszközt adnak a kezünkbe, hogy optimalizálhassuk a termelési hatékonyságot, és ezzel párhuzamosan csökkenthessük a termelés okozta környezeti terhelést [1, 23].

A gépi tanulási rendszerek alapja a megfelelő pontossággal gyűjtött adathalmaz

A mesterséges neurális hálóak segíthetnek optimalizálni a termelési hatékonyságot és csökkenteni a környezeti terhelést

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A munka az Európai Unió támogatásával valósult meg, az RRF-2.3.1-21-2022-00004 MILAB azonosítójú, Mesterséges Intelligencia Nemzeti Laboratórium projekt keretében.

IRODALOM

- Benos L, Tagarakis A, Dolias G, Berruto R, Kateris D, Bochtis D (2021) Machine learning in agriculture: A comprehensive updated review. *Sensors* 21:3758. <https://doi.org/10.3390/s21113758>
- Nagy S, Tózsér D, Szombath G, Baranyi D, Reibling T, Biksi I, Solymosi N (2017) Statisztikai ellenőrző diagramok az állattermék-előállításban. *Magy Állatorvosok Lapja* 139:515–523
- Cockburn M (2020) Application and prospective discussion of machine learning for the management of dairy farms. *Animals* 10:1690. <https://doi.org/10.3390/ani10091690>
- Slob N, Catal C, Kassahun A (2021) Application of machine learning to improve dairy farm management: A systematic literature review. *Prev Vet Medicine* 187:105237. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105237>
- Sarker I (2021) Machine learning: Algorithms, real-world applications and research directions. *SN Comput Sci* 2:1–21. <https://doi.org/10.1007/s42979-021-00592-x>
- Greener J, Kandathil S, Moffat L, Jones D (2022) A guide to machine learning for biologists. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:40–55. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00407-0>
- Bi Q, Goodman K, Kaminsky J, Lessler J (2019) What is machine learning? a primer for the epidemiologist. *Am Journal Epidemiology* 188:2222–2239. <https://doi.org/10.1093/aje/kwz189>
- Machuve D, Nwankwo E, Mdma N, Mbelwa J (2022) Poultry diseases diagnostics models using deep learning. *Front Artif Intell* 5:733345. <https://doi.org/10.3389/frai.2022.733345>
- McCulloch W, Pitts W (1943) A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys* 5:115–133
- Kleene S, Ashby W, Culbertson J, Davis M, De Leeuw K, Mac Kay D, McCarthy J, Minsky M, Moore E, Shannon C, Shapiro N, Uttley A, Von Neumann J (1956) Representation of events in nerve nets and finite automata. Shannon C, McCarthy J (eds) *Automata Studies*, Princeton University Press, pp 3–42
- Nayeri S, Sargolzaei M, Tulpan D (2019) A review of traditional and machine learning methods applied to animal breeding. *Anim Health Res Rev* 20:31–46. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000148>
- Nagy S, Kilim O, Csabai I, Gábor G, Solymosi N (2023) Impact evaluation of score classes and annotation regions in deep learning-based dairy cow body condition prediction. *Animals* 13:194. <https://doi.org/10.3390/ani13020194>
- Mao A, Giraudet C, Liu K, Nolasco I, Xie Z, Xie Z, Gao Y, Theobald J, Bhatta D, Stewart R, McElligott A (2022) Automated identification of chicken distress vocalizations using deep learning models. *J Royal Soc Interface* 19:20210921. <https://doi.org/10.1098/rsif.2021.0921>
- Nagy S, Tóth A, Papp M, Kaplan S, Solymosi N (2022) Antimicrobial resistance determinants in silage. *Sci Reports* 12:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09296-5>
- Tóth A, Csabai I, Krikó E, Tózsér D, Maróti G, Patai Á, Makrai L, Szita G, Solymosi N (2020) Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. *Sci Reports* 10:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>
- Tóth A, Csabai I, Maróti G, Jerzsele Á, Dubecz A, Patai Á, Judge M, Nagy S, Makrai L, Bányai K, Szita G, Solymosi N (2020) A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt. *Sci Reports* 10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80444-5>
- Tóth A, Csabai I, Judge M, Maróti G, Becsei Á, Spisák S, Solymosi N (2021) Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics. *Antibiotics* 10:1287. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111287>
- Paolillo G, Petrini A, Casiraghi E, De Iorio M, Biffani S, Pagnacco G, Minozzi G, Valentini G (2022) Automated image analysis to assess hygienic behaviour of honeybees. *PLoS one* 17:e0263183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263183>
- Bilik S, Kratochvila L, Ligocki A, Bostik O, Zemcik T, Hybl M, Horak K, Zalud L (2021) Visual diagnosis of the Varroa Destructor parasitic mite in honeybees using object detector techniques. *Sensors* 21:2764. <https://doi.org/10.3390/s21082764>
- Alves T, Pinto A, Ventura P, Neves C, Biron D, Junior A, De Paula Filho P, Rodrigues P (2020) Automatic detection and classification of honey bee comb cells using deep learning. *Comput Electron Agric* 170:105244. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105244>
- Rachineni K, Kakita V, Awasthi N, Shirke V, Hosur R, Shukla S (2022) Identifying type of sugar adulterants in honey: Combined application of NMR spectroscopy and supervised machine learning classification. *Curr Research Food Science* 5:272–277. <https://doi.org/10.1016/j.crfcs.2022.01.008>
- Odorčić M, Rasmussen M, Paulrud C, Bruckmaier R (2019) Milking machine settings, teat condition and milking efficiency in dairy cows. *Animal* 13:94–99. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000417>
- Liakos K, Busato P, Moshou D, Pearson S, Bochtis D (2018) Machine learning in agriculture: A review. *Sensors* 18:2674. <https://doi.org/10.3390/s18082674>
- Kang X, Zhang X, Liu G (2020) Accurate detection of lameness in dairy cattle with computer vision: A new and individualized detection strategy based on the analysis of the supporting phase. *J Dairy Science* 103:10628–10638. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18288>
- Shahinfar S, Khansefid M, Haile-Mariam M, Pryce J (2021) Machine learning approaches for the prediction of lameness in dairy cows. *Animal* 15:100391. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100391>
- Wang J, Bell M, Liu X, Liu G (2020) Machine-learning techniques can enhance dairy cow estrus detection using location and acceleration data. *Animals* 10:1160. <https://doi.org/10.3390/ani10071160>
- Tao Y, Li F, Sun Y (2022) Development and implementation of a training dataset to ensure clear boundary value of body condition score classification of dairy cows in automatic system. *Livest Sci* 259:104901. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104901>
- Zhao K, Zhang M, Shen W, Liu X, Ji J, Dai B, Zhang R (2023) Automatic body condition scoring for dairy cows based on efficient net and convex hull features of point clouds. *Comput Electron Agric* 205:107588. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.107588>
- Lopes B, Silva L, Blanquet I, Georgieva P, Marques C (2021) Prediction of fish mortality based on a probabilistic anomaly detection approach for recirculating aquaculture system facilities. *Rev Sci Instrum* 92:025119. <https://doi.org/10.1063/5.0045047>
- Zhou C, Xu D, Chen L, Zhang S, Sun C, Yang X, Wang Y (2019) Evaluation of fish feeding intensity in aquaculture using a convolutional neural network and machine vision. *Aquaculture* 507:457–465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.056>
- Fernandes A, Turra E, De Alvarenga É, Passafaro T, Lopes F, Alves G, Singh V, Rose G (2020) Deep learning image segmentation for extraction of fish body measurements and prediction of body weight and carcass traits in Nile tilapia. *Comput Electron Agric* 170:105274. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105274>

32. Liu Y, Zhang Q, Song L, Chen Y (2019) Attention-based recurrent neural networks for accurate short-term and long-term dissolved oxygen prediction. *Comput Electron Agric* 165:104964. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.104964>
33. Neethirajan S, (2020) The role of sensors, big data and machine learning in modern animal farming. *Sens Bio-Sensing Res* 29:100367. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100367>
34. Zhang J, Zhuang Y, Ji H, Teng G, (2021) Pig weight and body size estimation using a multiple output regression convolutional neural network: A fast and fully automatic method. *Sensors* 21:3218. <https://doi.org/10.3390/s21093218>
35. Ahmadi H, Rodehutsord M (2017) Application of artificial neural network and support vector machines in predicting metabolizable energy in compound feeds for pigs. *Front Nutr* 4:27. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00027>
36. Brünger J, Dippel S, Koch R, Veit C, (2019) 'Tailception': using neural networks for assessing tail lesions on pictures of pig carcasses. *Animal* 13:1030–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731118003038>
37. Wutke M, Heinrich F, Das P, Lange A, Gentz M, Traulsen I, Warns F, Schmitt A, Gültas M (2021) Detecting animal contacts—a deep learning-based pig detection and tracking approach for the quantification of social contacts. *Sensors* 21:7512. <https://doi.org/10.3390/s21227512>
38. Kim M, Choi Y, Lee J, Sa S, Cho H (2021) A deep learning-based approach for feeding behavior recognition of weanling pigs. *J Anim Sci Tech* 63:1453. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e127>
39. Li Z, Zhang T, Cuan K, Fang C, Zhao H, Guan C, Yang Q, Qu H (2022) Sex detection of chicks based on audio technology and deep learning methods. *Animals* 12:3106. <https://doi.org/10.3390/ani12223106>
40. Ahmad H (2009) Poultry growth modeling using neural networks and simulated data. *J Appl Poult Res* 18:440–446. <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00064>
41. Savegnago R, Nunes B, Caetano S, Ferraudo A, Schmidt G, Ledur M, Munari D (2011) Comparison of logistic and neural network models to fit to the egg production curve of white leghorn hens. *Poult Sci* 90:705–711. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00723>
42. Guo Y, Aggrey S, Wang P, Oladeinde A, Chai L (2022) Monitoring behaviors of broiler chickens at different ages with deep learning. *Animals* 12:3390. <https://doi.org/10.3390/ani12233390>
43. Liang N, Sun S, Zhang C, He Y, Qiu Z (2022) Advances in infra-red spectroscopy combined with artificial neural network for the authentication and traceability of food. *Critical Rev. Food Sci Nutr* 62, 2963–2984. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862045>
44. Funes E, Allouche Y, Beltrán G, Jiménez A (2015) A review: artificial neural networks as tool for control food industry process. *J Sens Technol* 5:28–43. <https://doi.org/10.4236/jst.2015.51004>
45. Coronel-Reyes J, Ramirez-Morales I, Fernandez-Blanco E, Rivero D, Pazos A (2018) Determination of egg storage time at room temperature using a low-cost NIR spectrometer and machine learning techniques. *Comput Electron Agric* 145:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.12.030>
46. Yu X, Yu X, Wen S, Yang J, Wang J (2019) Using deep learning and hyperspectral imaging to predict total viable count (tvc) in peeled pacific white shrimp. *J Food Meas Charact* 13:2082–2094. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00129-0>
47. Boutaba R, Salahuddin M, Limam N, Ayoubi S, Shahriar N, Estrada-Solano F, Caicedo O (2018) A comprehensive survey on machine learning for networking: evolution, applications and research opportunities. *J Internet Serv Appl* 9:1–99. <https://doi.org/10.1186/s13174-018-0087-2>
48. Yang X, Zhang S, Liu J, Gao Q, Dong S, Zhou C (2021) Deep learning for smart fish farming: applications, opportunities and challenges. *Rev Aquac* 13:66–90. <https://doi.org/10.1111/raq.12464>

Közlésre érkező: 2023. febr. 7.

Statistical control charts in the animal production

S. Á. Nagy¹
D. Tózsér¹
G. Szombath¹
D. Baranyi¹
T. Reibling²
I. Biksi³
N. Solymosi^{4*}

1. Állatorvostudományi Egyetem,
5. évfolyamos hallgató

*e-mail: solymosi.norbert@univet.hu

2. Duna-hyb Kft.,
Szekszárd, Páskum u. 5.

3. Állatorvostudományi Egyetem,
Haszonállatgyógyászati Tanszék
és Klinika

4. Állatorvostudományi Egyetem,
Biometeorológiai Kutatócsoport,
H-1078 Budapest, István u. 2.

Statisztikai ellenőrző diagramok az állattermék-előállításban

Nagy Sára Ágnes¹, Tózsér Dóra¹, Szombath Gergely¹, Baranyi Dániel¹, Reibling Tamás², Biksi Imre³, Solymosi Norbert^{4*}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen tanulmányukban egy példán keresztül mutatják be az iparban és az agráriumban széles körben alkalmazott statisztikai folyamatszabályozás alapvető eszközeinek, az ún. ellenőrző diagramoknak (control chart) létrehozásával, értelmezésével kapcsolatos fontosabb tudnivalókat. Információs társadalunkban az információs technológiák, köztük az adatelemzési eljárások az élet minden területét átszövik. Az állattermék-előállítás folyamataiban is egyre nagyobb mennyiségű digitális adat képződik, amelyek csak kis mértékben alakulnak át szakmailag értelmezhető információvá. A bemutatott eszköz segítheti az adatok hasznosítását.

SUMMARY

Background: In our age, the information society, the computer based technologies, including the data analytical procedures are part of each sites of the life. In the production animal sector more and more data are generated day by day. Unfortunately, only a small piece of this huge amount of data is transformed to information, that can be interpreted, used by professionals in decisions.

Objectives: The present work demonstrates a relatively simple statistical approach that may help to improve the production, animal health and welfare measures in animal production sector.

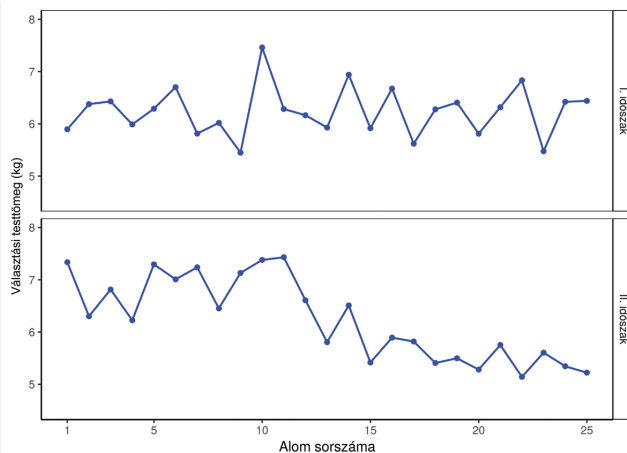
Materials and methods: Since the 1920s in the industry sector the Statistical Process Control (SPC) is a widely used toolbox to help the producers to improve the efficiency and profitability of production processes. The components of the SPC toolbox are the „magnificent seven”: histogram, check sheet, pareto chart, cause-and-effect diagram, defect concentration diagram, scatter diagram, control chart. The last one (also called as Shewhart chart) is the most widely used tool of SPC. Through a case study on piglet weaning weight the authors summarizes the most important momentums of the creation and interpretation of the control charts. In the example a real world based simulated dataset was used to construct the control charts. Beside this a short review is presented to demonstrate control chart applications in animal production areas.

Results and Discussion: The presented case study helps the reader to understand how the statistical control charts can improve the surveillance of animal production and animal health. The authors emphasise that in the „big data” age it is necessary to develop the computational, data analytical skills of veterinarians working on farms, to be able to convert the accumulating raw data to professionally usable information.

Korunk információs társadalmának sajátosságai – csakúgy, mint életünk legtöbb területére – az állati termék előállítására, annak folyamatára is vonatkoznak. Az állatok egészségére, környezetére, termelésére vonatkozó adatok az információs technológiák terjedésével egyre gyarapodnak.

A telepen képződő adatok információvá alakításában adatfeldolgozási eszközökre, ill. készségekre van szüksége a döntéshozó szakembereknek

A haszonállattartó telepeken számos adatgyűjtési folyamat során halmozódnak a termelésre vonatkozó adatok (pl. telepirányító rendszerek). További nagy mennyiségű adatot generálnak a precíziós állattartási (*Precision Livestock Farming, PLF*) technológiák (10). Ezek mellett eseti adatgyűjtések [pl. mobil technológiákkal (18)] is szaporítják a termelésre, az állatok egészségére vonatkozó telepi adatokat. Ezzel együtt a felhalmozódó adatoknak még mindig csak töredéke alakul át olyan információvá, amely a gazdálkodó vagy az állatorvos döntéseit segítheti. Pedig az állományok méretének növekedésével, a rendszerek bonyolultságának fokozódásával az állatorvosok, termelők hagyományos, személyes információszerzése már nem kivitelezhető időben (10, 13). Így a telepen képződő adatok információvá alakításában adatfeldolgozási eszközökre, ill. készségekre van szüksége a döntéshozó szakembereknek. A termelési folyamat mutatóinak értékelése során leginkább valamely időszakra vonatkozó jellemző értéket szoktak figyelembe venni a mindennapokban. Ez a jellemző érték statisztikai szóhasználattal valamilyen tesztstatisztika, vagy egyszerűbben fogalmazva: statisztika. A közérthetőség kedvéért tesztstatisztika pl. valamely mennyiségből számított átlag. Azonban fontos látni, hogy egy ilyen érték nem teszi lehetővé, hogy betekintést nyerjünk arra vonatkozóan, hogy a vizsgált időszakban az adott mérték milyen változatosságot mutatott. Például, ha méri a malacok választáskori testtömegét, akkor kiszámolható ennek vizsgált időszakbeli átlaga. De ez az átlagos választási testtömeg nem mond semmit az almonkénti (vagy hetenkénti) változásokról. Persze e mellé az átlagos érték mellé hozzátehetjük a testtömegek szórását, varianciáját is. Azonban még ekkor sem látjuk, hogy megfigyelhető-e változás a testtömegben mintáról mintára, alomról alomra. Ráadásul – ahogy az 1. ábrán is látható – teljesen eltérő tendenciájú mérési adatok mellett is adódhatnak azonos átlagok és szórások. Az 1. ábrán látható két időszakban a malacok választási testtömegének átlaga (6,24 kg) és szórása (1,28 kg) megegyező, annak ellenére, hogy szemmel is könnyen észrevehető az egyes almok átlagának variabilitásbeli eltérése. Míg az I. időszakban az átlagos testtömeg a 6,24 kg körül mozog, addig a II. időszak második felében jelentősen csökken és a teljes időszakra vonatkozó átlag alatt mozog.



1. ÁBRA. Malacok választáskori testtömegének almonkénti átlaga két időszakban. Az alom sorszáma időbeli sorrendet jelöl. Annak ellenére, hogy a görbék lefutása egyértelműen eltér, a testsúlyok átlaga és szórása (6,24 ± 1,28 kg) a két időszakban azonos

FIGURE 1. Average weights of weaned piglets per pen for two different time periods. The litter id presents the time order. Despite of the distinct runs of curves the means and standard deviations (6.24 ± 1.28 kg) in both periods are identical

A termelési folyamatok más területein (pl. az iparban) az 1920-as évektől elterjedt egy olyan egyszerű matematikai statisztikai eszköztár, amely könnyen vizsgálhatóvá teszi a fontosnak tekintett termelési mutatók időbeli változását. Ezáltal az optimálisnak vagy megszokottnak tekinthető termelési folyamatától való eltérés korán azonosítható. Aminek eredményeként korábban lehet beavatkozni, a folyamat eltéréseinek súlyosabbá válása előtt, így csökkentendő a gazdasági veszteségeket.

A termelési mutatók időbeli változásának követését és az arra épülő beavatkozások, korrekciók összességét statisztikai folyamat-szabályozásnak nevezik

A termelési folyamatoknak ezt a típusú értékelését és az arra épülő beavatkozások, korrekciók összességét statisztikai folyamat-szabályozásnak (*statistical process control, SPC*) nevezik. Az SPC szakirodalmában számos eszköz jelenik meg a folyamatok ellenőrzésére, szabályozására. Ezek közül a legismertebb az ún. ellenőrző diagram (*control chart, Shewhart-chart*). Az ellenőrző diagramot a magyar szakirodalomban sokszor ellenőrző kártyának nevezik, mi azonban itt a „kártya” helyett a kevésbé félreérthető „diagram” kifejezést használjuk.

Az ellenőrző diagramokat az állattartásban, állatitermék-előállításban, az állatok egészségével, szaporodásbiológiájával kapcsolatban széles körben alkalmazzák (5, 6, 8, 13, 15, 16). Az alábbiakban az ellenőrző diagramok értelmezésével kapcsolatos legfontosabb mozzanatokat egy példán keresztül mutatjuk be.

ELLENŐRZŐ DIAGRAMOK

A termelési folyamatok követésére különböző, a vizsgált folyamat értékelése szempontjából fontosnak tekintett paramétereket, mértékeket (pl. választási testtömeg, választásig elhullott malacok részaránya) használunk. Minden ilyen paraméter valamilyen mértékű változékonyságot mutat, ami azt jelenti, hogy az egyes időpontokra, időszakokra vonatkozó paraméterértékek eltérnek a célértéktől és egymástól.

A vizsgált paraméterértékek változékonyságának két oka lehet:

- a véletlen és
- az ún. azonosítható ok

A paraméterértékekben tapasztalható változékonyságnak két oka lehet (14): az egyik a véletlen (*chance causes of variation*), a másik az ún. azonosítható ok (*assignable causes of variation*). A termelés szabályozásának, ellenőrzésének fő célja, hogy az optimális célértéket biztosítsa, és a változékonyságot csökkentse. A véletlenből eredő variabilitással nem tudunk mit kezdeni. Azonban az azonosítható okok (pl. takarmányozási, tartási anomáliák) folytán adódó variabilitás csökkentése megvalósítható.

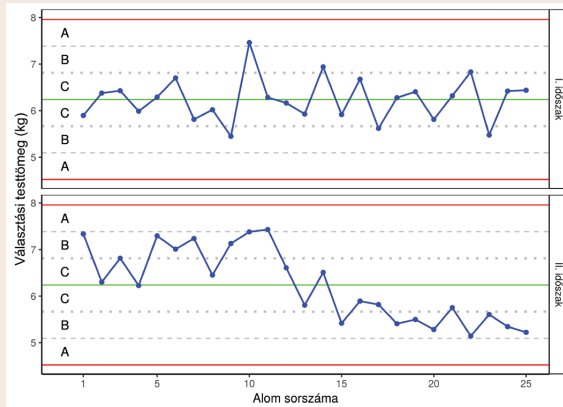
Annak eldöntése, hogy a célértéktől való eltérésnek milyen mértékénél kell beavatkozni, nem egyszerű feladat (16). Ebben használhatunk különböző szakirodalmi, tapasztalati viszonyítási értékeket (*benchmarks*). Ennek a megközelítésnek jogos kritikája, hogy legtöbb esetben a saját állományunktól (pl. fajta, takarmányozás, technológia vonatkozásában) eltérő állományból származó viszonyszámok állnak rendelkezésre.

Egy másik megközelítésben a saját állományunk termelési adatai alapján hozunk létre olyan viszonyítási értékeket, amelyek alapján a termelés folyamatát ellenőrizhetjük. Az ellenőrző diagramok ebben a típusú folyamatellenőrzésben nyújtanak segítséget. Az ellenőrző diagramok létrehozása során egy (saját véleményünk szerint) stabil időszakból származó paraméterértékeket gyűjtünk ki a rögzített adatainkból. Általános gyakorlat (14), hogy 25 csoportból, időpontból, időszakból (alcsoporthoz, *subgroup*) származó adatot használunk. Ezek alapján kiszámoljuk, hogy az adott időszakra milyen középérték (célérték) volt jellemző, ill. emellett azt is, hogy az ettől való eltérések milyen mértékűek. Ez utóbbit az ún. szigma (*sigma*) értékkel adjuk meg. Az ellenőrző diagramra a célértéket jelző vízszintes egyenes mellett figyelmeztetési és cselekvési határértékeket jelző egyeneseket helyezünk el (2. ábra).

Az ellenőrző diagramokon a célértéket jelző vízszintes egyenes mellett figyelmeztetési és cselekvési határértékeket jelző egyeneseket helyezünk el

A figyelmeztetési határokat a célértéktől számítva egy, ill. két szigma távolságban húzzuk meg (a 2. ábrán szürke pontozott, ill. szaggatott egyenes). A cselekvési határt jelző egyeneseket pedig a célértéktől számítva három szigma

(three sigma) távolságra (a 2. ábrán piros egyenes). Az ellenőrzési határok zónákat hoznak létre, az A-zóna a két és három szigma, a B-zóna az egy és két szigma, a C-zóna pedig a célérték és az egy szigma távolság közti tartományt jelenti (2. ábra).



2. ÁBRA. Malacok választáskori testtömegének almonkénti átlaga két időszakban. Az alom sorszáma időbeli sorrendet jelöl. A zöld egyenes a célértéket, a szürke és piros egyenes az ellenőrzési határokat jelöli. A célértéktől egy, ill. két szigma távolságban lévő szürke egyeneseket figyelmeztetési határnak nevezik. A célértéktől három szigma távolságban lévő piros egyenest cselekvési határnak is nevezik

FIGURE 2. Average weights of weaned piglets per pen for two different time periods. The litter id presents the time order. The green line is the target value, the grey and red lines are the control limits. The grey lines at one- and two-sigma from the target value are the warning limits. The red lines at three-sigma distance are the action limits

Az ellenőrző diagramok létrehozásának és felhasználásának két fázisát szokás megkülönböztetni. Az I. fázisban az előzőkben leírtak szerint egy megelőző, stabilnak tekinthető periódus (az 1. és 2. ábra I. időszaka) alapján létrehozuk a diagramot. A II. fázisban pedig az aktuális termelési folyamat paramétereit ábrázoljuk rajta, az adatképződés valós idejében. Ez utóbbi fázisban az ellenőrzési határok és zónák olyan támpontokat adnak a termelési folyamat értékeléséhez, amelyek segítségével az elvárt teljesítménytől való eltérést korán észlelhetjük, így ha az eltérés okát korábban azonosíthatjuk, ill. kezelhetjük, akkor csökkenthetjük a gazdasági veszteséget.

Az SPC csaknem száz éves története során először az iparban (14) hoztak létre olyan szabályokat, amelyek segítik az ellenőrző diagram mintázatának értékelését. Ugyanezeket a szabályokat használják az állattermék-előállítás folyamatainak ellenőrzésében (6, 15).

Az alábbi négy szabályban bemutatott mintázatbeli változások arra utalnak, hogy a folyamat kikerülhetett az ellenőrzésünk alól, így indokolt lehet valamely kiváltó ok azonosítása:

1. Egy pont kívül esik a három szigma határon.
2. Három egymást követő pont közül kettő kívül esik a két szigma figyelmeztetési határon.
3. Öt egymást követő pont közül négy egy szigma távolságban vagy azon túl helyezkedik el.
4. Nyolc egymást követő pont a középvonal egyik oldalán helyeződik el.

A 2. ábrán bemutatott példánkban, a II. időszakban a 3. és 4. szabályban megfigalmazott eltéréseket láthatjuk. Így feltételezhető, hogy a malacok választási testtömegében bekövetkezett változás nem tulajdonítható tisztán a véletlennek, természetes biológiai változékonyságnak, hanem valamilyen azonosítható ok is állhat a háttérben. Anélkül, hogy a matematikai statisztikai részletekben elmerülnénk, meg kell jegyezni, hogy az ellenőrző diagramok alapján bizonyos valószínűséggel téves következtetésre is juthatunk. A diagram alapján ugyanis gondolhatjuk azt, hogy a folyamat kézbe tartott, holott kicsúszott már az ellenőrzésünk alól (téves negatív), ill. azt is, hogy kikerült a kezünk közül, pedig ez valójában nem történt meg (téves pozitív).

Bizonyos mintázatbeli változások arra utalnak, hogy a folyamat kikerülhetett az ellenőrzésünk alól

A fenti négy szabály egyes folyamatokban nem megfelelő érzékenységű, így alkalmazásukkal nem azonosíthatjuk a folyamat eltéréseit. A diagramok „érzékenyebbé” tétele céljából esetenként további szabályokat használnak:

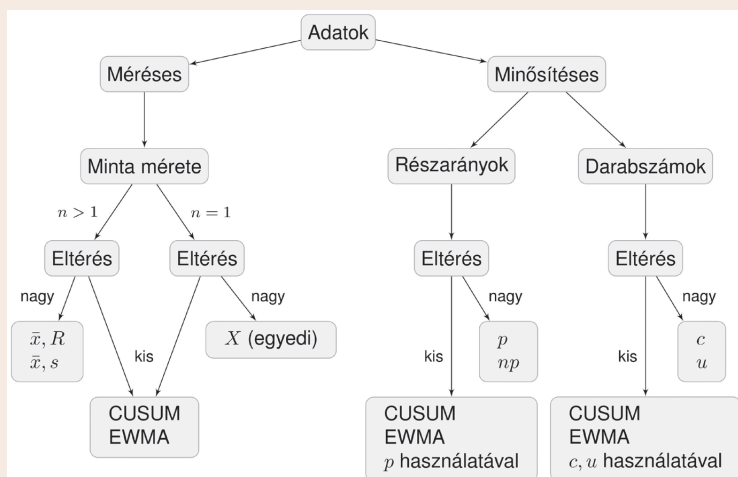
5. Hat egymást követő pont folyamatosan növekvő vagy csökkenő tendenciát mutat.
6. Tizenöt egymás utáni pont a C-zónában (a középvonal alatti és feletti).
7. Tizennégy egymás utáni pont váltakozva a középvonal alatt és felett helyezkedik el.
8. Nyolc pont, amely egyik oldali C-zónába sem esik.
9. A pontok szokatlan vagy nem véletlen mintázata.
10. Egy vagy több pont közel a figyelmeztetési vagy cselekvési határhoz.

Az utóbbi hat érzékenyítő szabály bármelyikének alkalmazásával a diagram által jelzett téves pozitív események valószínűsége megnő, így gyakrabban kaphatunk „riasztást”, mint ahányszor a folyamat valóban azonosítható ok miatt tér el a céltől. Az SPC szakirodalmában ezért gyakran hangsúlyozzák, hogy az ellenőrző diagramok automatikus jelzéseit az adott esetnek megfelelően kell értékelni, és annak alapján ajánlott az okok azonosításába kezdeni (14).

A diagramoknak két fő csoportját különítjük el: méréses és minősítéses diagramok

AZ ELLENŐRZŐ DIAGRAM TÍPUSAI

Attól függően, hogy milyen típusú adatokat használunk a folyamat felügyeletében, különböző ellenőrző diagramokat alkalmazunk (3. ábra). A diagramoknak két fő csoportját különítjük el: méréses és minősítéses diagramok. A méréses diagramok esetén olyan adatok (*numerical measurement*) jelentik az elemzés forrását, amelyeket valamilyen módon számszerűen mértünk (pl. testtömeg, tejtermelés, takarmányfogyasztás, levegő-hőmérséklet). A termelési folyamatoknak vannak olyan mutatói, amelyek nem mérhetők számszerűen (*attributes data*) abban az értelemben, mint az előző esetben (pl. nem megfelelő teljesítményű egyedek száma, részaránya). A minősítéses diagramok esetén a termelési folyamat eredményét jelentő elemet (pl. egyed, alom) kétféleképpen minősíthetjük: lehet megfelelő (*conforming*) és nem megfelelő (*nonconforming*). Természetesen ennek eldöntésében szerepelhetnek ún. méréses adatok, azonban a minősítésüket tekintve csak a két kimeneti érték rendelhető hozzájuk.



3. ÁBRA. Mikor melyik ellenőrző diagramot tanácsos használni? Az adatok típusától, az azonosítandó eltérések mértékétől függően más és más diagramot célszerű alkalmazni [MONTGOMERY (14) után]

FIGURE 3. What control chart is appropriate to use? Depending on data type and the deviations to be detected different control charts should be used [following MONTGOMERY (14)]

A méréses diagramok alkalmasak arra, hogy segítségével elemezzük a folyamat során vett minták átlagát, ill. változékonyságát

A minősítéses diagramoknak több típusát is használják az állattermék-előállítás kapcsolatos szakirodalomban

A méréses diagramok alkalmasak arra, hogy segítségével elemezzük a folyamat során vett minták átlagát, ill. változékonyságát. A mért értékek átlagának vizsgálatára használjuk az ún. \bar{x} -diagramot, a 2. ábrán bemutatott példa is ilyen. Ezzel a diagrammal a minták közötti variabilitást tudjuk vizsgálni. A mintákon belüli variabilitást az ún. R - és s -diagramokkal ellenőrizhetjük. Baromfivágóhidakon a hasított testrészek mikrobiológiai felügyeletében mutatta be MATARAGAS és mtsai az \bar{x} - és R -diagram alkalmazhatóságát (12).

A minősítéses diagramoknak több típusát (3. ábra) is használják az állattermék-előállítással kapcsolatos szakirodalomban. A p -diagrammal a nem megfelelő elemek részarányát (*control chart for fraction nonconforming*), a c -diagrammal a nem megfelelő elemek számát (*control chart for nonconformities*), az u -diagrammal pedig a nem megfelelő elemek egységenkénti (pl. almonként, légterenként) számát (*control chart for nonconformities per units*) ellenőrizhetjük. Az állatorvosi, állattartási, élelmiszer-biztonsági szakirodalomban leggyakrabban a p -diagramot használják. Ennek oka részben az, hogy míg a méréses diagramokhoz szükséges adatok korlátozottan állnak rendelkezésre a telepi körülmények között, a minősítéses adatok elérhetőek, könnyen létrehozhatóak. CORNOU és mtsai például szarvasmarhák vemhesülési arányának (4), GÜNEY és GÖKHAN pedig a sérült héjú tojások részarányának monitoringjában használta a p -diagramot (9).

Az eddig bemutatott Shewhart-diagramok megfelelő érzékenységek, ha a folyamateltérés 1,5–2 szigma nagyságú. Ennél kisebb eltolódást csak az érzékenyítő szabályokkal mutathatunk ki, amelyek viszont növelik a téves riasztások számát (14). A kisebb eltérések követésére további diagramtípusokat fejlesztettek. Az egyik ilyen a halmozódó összegek diagramja (*cumulative sum, CUSUM*), amely a céltől való eltéréseket összeadja, és az ezekből származtatott értékeket ábrázolja. Ilyen diagramot használtak sertésalomméreteket (1), fialási (2), ill. elhullási arányok felügyeletére (3). További, a kis eltérések vizsgálatában gyakrabban használt típus az exponenciálisan súlyozott mozgóátlag-diagram (*Exponentially Weighted Moving Average, EWMA*). Ezt a módszert használta von LEESEN és mtsai (19) szarvasmarhák progeszteronszintjének vizsgálatában, ill. LINHARES és mtsai PRRS-mentesítési program hatékonyságának ellenőrzésében (11). A statisztikai részleteket itt mellőzve a CUSUM-ról és az EWMA-ról érdemes megjegyezni, hogy a mintánkénti értékeket nem egymástól függetlenül értékelhetjük általuk, hanem a mintákban tapasztalt eltéréseket egymással összefüggésben. A 3. ábra segítséget nyújt az adott folyamat ellenőrzésében használandó diagramtípusok kiválasztásában.

Az állattermék-előállítás területén 2010 előtt közölt ellenőrződiagram-alkalmazásokra vonatkozóan DE VRIES és RENEAU részletes irodalmi áttekintést nyújt az érdeklődő olvasó számára (6).

MEGVITATÁS

Az információs társadalom minden területén, így a haszonállattartásban is jelentős mennyiségű adat jön létre napról napra. Ennek a folyamatosan növekvő mennyiségű adatnak a kihasználtsága jelenleg alacsony szintű, annak ellenére, hogy a termelés, az állatok egészsége és jóléte szempontjából nagyon fontos információkat rejt magában. A bemutatott ellenőrző diagramok hasznos eszközök az állattermék-előállítás termelési folyamatainak felügyeletében. A létrehozásukhoz szükséges adatok számos fontos termelés-ellenőrzési paraméterre vonatkozóan rendelkezésre állnak a telepírányító rendszerek adatbázisában. A hazai telepírányító rendszerek nem tartalmazzák jelenleg az SPC-hez szükséges modulokat, így a telepeken meglévő adatok elemzéséhez egyéb, rugalmas adatelemzésre alkalmas szoftverre van szükség. Az R -nyelv és -környezet erre alkalmas, ingyenesen felhasználható eszköz (7, 17).

A bemutatott ellenőrző diagramok hasznos eszközök az állattermék-előállítás termelési folyamatainak felügyeletében

Mivel az egyetemi hallgatók (a jövő állatorvosai) életét keresztül-kasul szövi az informatika, remélhető, hogy az ő készségeikkel, naprakész tudásukkal a telepeken már megjelenhet az adatelemzés, feldolgozás gyakorlata. Az alkalmazott statisztika számos területén igaz, hogy a legjobb, ha a szakmai kérdést felvető személy végzi az elemzéseket, ill. értelmezi azok eredményeit. Így az állatorvosi ismereteken alapuló kérdésfeltevést követően az állatorvos önmaga tudja ezeket az egyszerű elemzéseket elvégezni, majd pedig (ugyancsak orvosi ismeretei alapján) értelmezni az eredményeket. Szakmánk helyzetének erősítése érdekében is jó lenne, ha a telepen dolgozó szakemberek közül az állatorvos lenne az a személy, aki ezt a feladatkört is ellátja.

Az Állatorvostudományi Egyetem 2016/2017. tanév őszi félévében egy fakultatív tantárgy keretében az R-nyelv és eredeti telepi adatbázisok használatával sajtótították el hallgatók a fent bemutatott ellenőrző diagramok létrehozását, értelmezését. Ami azt jelentheti, hogy diákjaink – de legalábbis egy részük – nyitottak az ezirányú képzésre, és rendelkeznek azokkal a készségekkel, amelyek szükségesek valós szakmai kérdések megválaszolását célzó adatelemzések kivitelezéséhez. Az állatorvosképzésben a hallgatók ilyen irányú, gyakorlati képzésének igen nagy jelentősége lenne. Különben egy a XXI. században központi feladatkörből csúszhatnak ki a jelen és jövő kollégái.

IRODALOM

1. BONO, C. – CORNOU, C. – KRISTENSEN, A. R.: Dynamic production monitoring in pig herds I: Modeling and monitoring litter size at herd and sow level. *Livest. Sci.*, 2012. 149. 289–300.
2. BONO, C. – CORNOU, C. et al.: Dynamic production monitoring in pig herds II. Modeling and monitoring farrowing rate at herd level. *Livest. Sci.*, 2013. 155. 92–102.
3. BONO, C. – CORNOU, C. et al.: Dynamic production monitoring in pig herds III. Modeling and monitoring mortality rate at herd level. *Livest. Sci.*, 2014. 168. 128–138.
4. CORNOU, C. – ØSTERGAARD, S. et al.: Dynamic monitoring of reproduction records for dairy cattle. *Comput. Electron. Agr.*, 2014. 109. 191–194.
5. DE VRIES, A.: *Statistical process control charts applied to dairy herd reproduction*. PhD thesis, University of Minnesota. 2001.
6. DE VRIES, A. – RENEAU, J. K.: Application of statistical process control charts to monitor changes in animal production systems. *J. Anim. Sci.*, 2010. 88. E11–E24.
7. DINYA E. – SOLYMOSSI N.: *Biometria a klinikumban 2. Feladatok megoldása R-környezetben*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt. 2016.
8. ENGLER, J. – TÖLLE, K. H. et al.: Control charts applied to individual sow farm analysis. IN Cox S. (szerk.): *Precision Livestock Farming '05*. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands, 2005. 319–325.
9. GÜNEY, M. C. – GÖKHAN, T. K.: Determination of egg shell quality with p control charts in poultry. *TURJAF.*, 2016. 4. 588–591.
10. KÖNYVES L. – REIBLING T. – BODOR A. – BRYDL E. – ADORJÁN A. – SOLYMOSSI N.: Egy precíziós állattartási projekt tapasztalatai. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2015. 137. 719–727.
11. LINHARES, D. C. L. – CANO, J. P. et al.: Comparison of time to PRRSv-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSv in sow herds. *Prev. Vet. Med.*, 2014. 116. 111–119.
12. MATARAGAS, M. – DROSINOS, E. H. et al.: Integrating statistical process control to monitor and improve carcasses quality in a poultry slaughterhouse implementing a HACCP system. *Food Control*, 2012. 28. 205–211.
13. MERTENS, K. – DECUYPERE, E. et al.: Statistical control charts as a support tool for the management of livestock production. *J. Agr. Sci.*, 2011. 149. 369–384.
14. MONTGOMERY, D.: *Introduction to Statistical Quality Control*. 7th edition. John Wiley Sons. New York, USA, 2009.
15. MORRISON, R. B. – DIAL, G. D. et al.: Using Statistical Process Control to Investigate Reproductive Failure in Swine. In: YOUNGQUIST R. S. – THRELFALL W. R. (szerk.): *Current Therapy in Large Animal Theriagenology*. Saunders. St. Louis, USA, 2006. 821–826.
16. RADOSTITS, O.: *Herd Health: Food Animal Production Medicine*. W.B. Saunders. 2001.
17. SOLYMOSSI N.: *R<-...erre, erre...! (Bevezetés az R-nyelv és -környezet használatába)*. <http://cran.rproject.org/doc/contrib/Solymosi-Rj-egyzet.pdf>. 2005.
18. SOLYMOSSI N. – MAZZUCATO, M. et al.: VetEpiGIStool: járványos betegségek kontrollját segítő szabad felhasználású QGIS plugin. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2016. 138. 70.
19. VON LEESEN, R. – TETENS, J. et al.: Mathematical approaches to detect low concentrations in progesterone profiles. *Animal*, 2013. 7. 2008–2015.

Közlésre érk.: 2017. jan. 30.