

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Különböző baktérium és gomba levestenyészetek
élőcsíraszámának meghatározására szolgáló digitális
képalkotó eljárás kifejlesztése és tesztelése**

Készítette: Czeiszing Péter

Témavezetők: Dr. Makrai László, egyetemi docens
Dr. Solymosi Norbert, egyetemi docens

Budapest, 2020

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés.....	4
Szakirodalmi áttekintés	7
Célkitűzések	9
Anyag és módszer	10
A baktériumok és gombák tenyésztési folyamata	10
A fajok kódolása	11
A kísérletben részt vevő baktérium-, és gombafajok	12
Képfeldolgozás	19
Határérték paraméter	23
Eredmények.....	24
Megbeszélés	30
Összefoglalás.....	35
Summary	37
Irodalomjegyzék.....	39
Köszönetnyilvánítás	42

Rövidítések jegyzéke

B	black / fekete
CFU	colony forming unit / telepformáló egység
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
OE	otitis externa / külső hallójárat gyulladás
TGE	tripton, glükóz, élesztőkivonat
W	white / fehér

Bevezetés

Az állatorvosi bakteriológia, infektológia és élelmiszer-mikrobiológia területén is sok esetben szükség van egy mintában, vagy levestenyészetben az élőcsíraszám meghatározásra.

A legtöbb baktérium (néhány kivételtől eltekintve) táptalajokon tenyészhető mesterséges viszonyok között. Ezeknek a táptalajoknak víz és ásványi sók mellett tartalmazniuk kell szükséges tápanyagokat, vitaminokat, valamint kiegészítő anyagokat. Ezek mellett izotóniásnak is kell lenniük a megfelelő pH és sterilitás mellett. A táptalajok különféle nitrogénforrásként fehérjéket, fehérjehidrolizátumokat, aminosavakat, vagy ammóniumsókat, szénhidrátforrásként pedig poliszacharidokat, cukrokat, cukoralkoholokat, glikozidákat, szerves savakat, stb. tartalmazhatnak. Vitaminforrásként a táptalajokhoz rendszerint élesztőkivonatot, és (a kényesebb törzsek esetén) egyéb anyagokat is adhatunk.

A táptalajok konzisztenciájukat tekintve folyékony, félfolyékony vagy szilárd kategóriákba sorolhatók. Tápanyagaik lehetnek természetes anyagok, de sokszor előfordul, hogy kémiai anyagokból állítják elő. Az úgynevezett minimális táptalajok esetében a táptalaj csak a baktériumok által még hasznosítható legegyszerűbb anyagokat tartalmazza. A baktériumoknak a táptalajokkal szembeni igénye igen sokrétű, ennek megfelelően sokféle, változatos összetételű táptalajt használunk. A táptalajokat különböző komponenseiből rendszerint magunk állítjuk elő laboratóriumi körülmények között, azonban manapság egyre elterjedtebb a kereskedelmi forgalomban előforduló előre elkészített táptalajok megvásárlása is. A Petri-csészékbe frissen kiöntött táptalajok hűtőszekrényekben néhány napig eltarthatók.

Kísérletünkben kizárólag szilárd táptalajokra történő szélesztések kerültek dokumentációra. A szilárd táptalajok gélek, alapanyaguk olyan tápfolyadékok, amelyekbe rendszerint agar-agart, vagy ritkább esetben zselatint kevernek. A zselatin csak szobahőmérsékleten szilárd, testhőmérsékleten már folyékony halmazállapotú, így csak szobahőn használható. Az agar-agar tengeri moszatokból előállított, szálas szerkezetű anyag, amelyet ha 1-2%-ban a táptalajhoz adunk, 80-100 °C között megolvad, 40-45 °C között pedig szilárd géllé dermed. A baktériumok izolálására alkalmasak a szilárd táptalajok, rajtuk a baktériumok önálló telepeket képeznek.

Bakteriológiai vizsgálatok végzése során a vizsgálandó anyagokból minimális mennyiséget a szilárd táptalajok felszínére kenünk (szélesztés), így a táptalajok felületén az inkubációt

követően a beoltott baktériumok telepeket képeznek. A szilárd táptalaj felületén kinőtt baktériumtelepek összességét nevezzük tenyészetnek. Primer tenyészet esetében a táptalajok felületén több baktériumfaj is megjelenhet egyszerre, így az adott baktérium fajának meghatározására (alaki, tenyésztésbeli, anyagcsere, stb. sajátságok vizsgálata) szintenyészetet állítunk elő. A szintenyészetek előállítását megkönnyíti a szelektív táptalajok alkalmazása, mely olyan anyagokat tartalmaz, amely csak bizonyos fajok szaporodását teszi lehetővé. Továbbá alkalmazhatunk differenciáló táptalajokat is, melyek olyan anyagokat tartalmaznak, amelyek felhasználása során a kinőtt baktériumtelepek egymástól megkülönböztethetőek lesznek. Szilárd táptalajokon inkubációt követően képződött telepek rendszerint egy, ritkán több (hígítási foktól függően) baktériumból indultak fejlődésnek. Az egy telepből továbboltott tenyészetet nevezzük törzsnek. A táptalajok felszínén képződött telepek színe, alakja, nagysága, konzisztenciája, stb. jellemző az egyes fajokra.

A megfigyelni kívánt baktériumokat rendszerint 37 °C-on tenyésztjük termosztátban pár napig, leggyakrabban közönséges levegőn, esetenként oxigén kizárásával, anaerob viszonyok között. A táptalajoknak az anaerob baktériumok tenyésztésekor megfelelően kis redoxipotenciálúnak kell lenniük, mely fenntartása végett a táptalajokba könnyen redukálható anyagokat kevernek (pl. szulfátok, cisztein, tioglikolát). Továbbá kellő mennyiségben kell tartalmazniuk könnyen fermentálható tápanyagokat. Az inkubálás során több lehetőség is rendelkezésre áll anaerob viszonyok létesítésére, többek között a tenyészetek fölötti légtérből kémiai úton elvonjuk az oxigént, vagy ha a táptalajokat vastag falú edénybe tesszük (anaerosztát), és belőle a levegőt kiszivattyúzzuk, vagy katalizátorral a levegő oxigénjét vízzé alakítjuk. A szigorúan anaerob fajok oltásakor és tenyésztésekor további speciális berendezések és eljárások is igénybe vehetők.

A baktériumok egyszerű, haránt irányú kettéosztódással szaporodnak. Osztódás előtt a baktérium teste megnő, pálcika alakú baktériumok esetében megnyúlik, a cytoplasmahártya betüremkedik a sejttest egyik pontján, majd ez a betüremkedés fokozatosan lefűzi az így keletkező két új sejtet. A sejtfalképződés a lefűződéssel egy időben megindul a cytoplasmahártya külső felületén, a sejtosztódás folyamata e sejtfal kialakulásával ér véget.

Szaporodás közben, optimális viszonyok között, in vitro, a baktériumok száma bizonyos törvényszerűséget követve változik. Ez akkor érzékelhető jól, ha időközönként újra és újra meghatározzuk egy folyékony táptalajba oltott baktériumok számát. Megkülönböztetünk összcsíraszámot (élő és elpusztult baktériumok összessége), és élőcsíraszámot. Az

összcsíraszám meghatározható a vérszámamláláshoz hasonló módokon (pl. Bürker-kamrában), ha a baktériumokat előzetesen megfestettük, vagy akár a baktériumtenyészet sűrűségének fotoelektromos úton történő mérésével is. Az élőcsíraszám meghatározására a gyakorlatban leggyakrabban a hígítási módszert alkalmazzuk. A vizsgálni kívánt baktériumszuszpenzió egységnyi mennyiségéből hígítási sort készítünk, és a különböző hígításokból egységnyi mennyiségeket mérünk az agarlemezekre, és azt szélesztjük, vagy a lehűlő agarba keverjük, és az így képződött telepeket megszámloljuk. A képződött telepek számából többé-kevésbé pontosan kiszámolható az eredeti szuszpenzió élőcsíraszám. Ennek során azt a Petri-csészét választjuk ki, amelyen 30-300 közötti baktériumtelep látható. Ezeket a baktériumtelepeket kell szabad szemmel megszámlolni és ebből lehet visszakövetkeztetni az eredeti baktériumszuszpenzió élőcsíraszámára (Tuboly et al., 1999).

Élőcsíraszám meghatározás a mikrobiológia számos területén szükséges. Megemlíthetjük többek között az élelmiszerhigiéna területét, szaporodási kísérleteket (annak vizsgálata, hogy melyik táptalajon képes az adott baktériumfaj a gyorsabb növekedésre: a vizsgálandó táptalajok mindegyikébe beleoltjuk a baktériumtörzset, majd a megfelelő időközönként kioltva és megszámlolva a telepeket eldöntjük melyik táptalajban nőtt a leggyorsabban), vagy a fertőzési kísérleteket (egy állat adott baktériumtörzsszel történő fertőzésekor szükséges tudnunk a fertőző szuszpenzió élőcsíraszámát, ezzel egységesítve a vizsgálatot). Kutatásunk végcélja ennek a folyamatnak az egyszerűsítése, és az élőkultúraigényének lecsökkentése.

Szakirodalmi áttekintés

A különböző képletek és objektumok számlálása mindig fontos eleme volt az adatgyűjtésnek a biológia számos területén. Gyakran előfordul, hogy szükséges megszámolni pollent (Costa & Yang, 2009), petéket (Mello et al., 2008; Slusarewicz et al., 2016), magvakat (Severini et al., 2011), sejtmagokat (Forero et al., 2010), sejteket (Kachouie et al., 2009), vagy mikroorganizmusokat (Yati & Dey, 2011). Mivel az efféle feladat sok időbe kerül, és bizonyos szintig szubjektív is, meglepő, hogy az ilyen feladatok automatizációja még nem széles körben elterjedt megoldás. Komponensek megszámolása leegyszerűsítve két lépésben zajlik: képfelvétel, és képelemzés. Manapság az olyan technológiák, mint a digitális kamera, vagy webkamera egyre nagyobb felbontást és jobb képminőséget kínálnak, és egyre inkább elérhetőek bármilyen felhasználó számára.

A mikrobiológia, sejtbiológia, immunológia és sok más tudományág rengeteg területén rutinfeladat a táptalajokon növekvő baktériumtelepek számolása. Az ilyen számolási eljárások automatizálása nem egyszerű feladat, mivel először izolálni kell a telepet a környezetétől, illetve ha összefolynak, akkor elkülöníteni őket egymástól. Továbbá az eljárásnak képesnek kell lennie műtermékek kiszűrésére, mint például az agar folytonossági hiányai, esetleges szennyeződés, vagy a Petri-csésze széle, esetleg visszatükröződő fény csillanása. Mivel a baktériumtelepek topológiailag relatív egyszerű objektumoknak vehetők, képről történő megszámolásukkal kapcsolatban régóta folytak kísérletek (Mansberg, 1957; Mukherjee et al., 1995). Kereskedelmi eszközöket is sikerült kifejleszteni (Putman et al., 2005), melyek azonban drágák maradtak. Valamint a tény, hogy az általuk kínált programok szabadalmazottak (nem nyílt forráskódúak), nagyon korlátozó a program módosítása vagy megosztása szempontjából, mert ritkán ismert az analízis folyamatának pontos menete. Ezzel ellentétben néhányan megjelentettek cikket nyílt forráskódú módszerekről, melyek alkalmasak digitális képekről történő sejtkolóniák számlálására (Niyazi et al., 2007; Bewes et al., 2008; Sieuwerts et al., 2008; Vokes & Carpenter, 2008; Clarke et al., 2010; Cai et al., 2011; Brugger et al., 2012). Ezek vagy önálló programként valósulnak meg, melyek képesek a képfájlok analízisére (Niyazi et al., 2007; Bewes et al., 2008; Kachouie et al., 2009; Clarke et al., 2010), kiegészítenek egy már létező képfeldolgozó programot (Cai et al., 2011; Sieuwerts et al., 2008; Vokes & Carpenter, 2008), vagy pedig önálló számláló rendszerek (Brugger et al., 2012).

Ezen módszerek mindegyike a szabad szemmel számolt értékeket megközelítő eredményeket produkálnak, javítva az objektivitást és megspórolva rengeteg időt. Viszont a módszerek egyike sem lett széleskörűen elterjedt. Azon túl, hogy sok biológus és kutató sosem hallott efféle programok létezéséről, a mindennapi munkába való beépülésük meggátolásához hozzájárultak teljesítménybeli hibák, mint például az összefolyt telepek elkülönítésére való képtelenség, vagy az adatfeldolgozásra fordított idő elnyúlása. Az is fontos egy módszer kidolgozásakor, hogy a program legyen erős és sokoldalú: jól kell, hogy teljesítsen a paraméterek módosítása nélkül akkor is, ha az optimális körülmények enyhén változnak, és esetleges műtermékek jelenléte csak minimális következménnyel járjon az eredmény szempontjából. Másik oka a módszerek el nem terjedésének az volt, hogy minimálisan felhasználóbarátok: még egy tökéletes programot sem alkalmaznának a gyakorlatban, ha az nem biztosít egy modern, könnyen kezelhető, és egyszerűen megérthető felületet. Az sem ritka, hogy a szerző letöltési link nélkül jelentet meg egy cikket egy módszerről, vagyis a nyilvános hozzáférés hiánya az, amely szintén gátolja az adott módszer elterjedését. Ráadásul a programnak a jövőben nagy valószínűséggel szüksége lesz frissítésekre is előre nem látható hibák miatt, illetve hogy ne váljon elavulttá (Geissmann, 2013).

A közelmúltban megjelent egy ingyenes és nyílt hozzáférésű telepszámláló szoftver, az OpenCFU (Geissmann, 2013). Ez egy számítógépre fejlesztett program, mely alkalmas baktériumtelepek, vagy egyéb kör alakú objektumok automatizált számlálására. Rendelkezik egy kezelő felülettel, ahol manuálisan kell beállítani a feldolgozás paramétereit, valamint miután elvégezte a számlálást, a feltöltött képen kiemeli (bekarikázza) a számolásba belevett képleteket is. A szoftver gyorsan fut, azonban a megfelelő paraméterek beállítása nélkül pontatlan eredményeket közöl, ami sokszor ahhoz vezet, hogy a különböző paramétereket állítgatva és próbálgatva jutunk csak a valóságot megközelítő értékhez. Továbbá ezzel kiszámíthatatlanná is teszi az esetleges műtermékek kizárását.

Az általunk létrehozott algoritmus fejlesztésekor arra törekedtünk, hogy a kísérletben résztvevő fajok mindegyike esetében megtaláljuk azt a határérték paramétert, ahol a lehető legpontosabban legyen képes a szoftver számolni a képeken látható telepeket, ezzel lehetőséget adva a jövőben esetleges további fejlesztésekre.

Célkitűzések

Manapság mobiltelefonjaink egyre nagyobb teljesítményre képesek, megközelítik a számítógépek teljesítményét is, mégsem elérhetőek az átlagos felhasználók számára. A laboratóriumban végzett munkát és adatrögzítést követően az eredményeket fel kell vinni a számítógépes rendszerbe, esetleg haza kell vinni és ott elvégezni a további munkálatokat. Azonban egy okoseszközre fejlesztett applikáció egyik előnye lehetne, hogy bárhová magunkkal tudjuk vinni, amellett, hogy könnyen áttekinthető felület fejlesztésével és egyszerű kezelhetőség kialakításával igencsak felhasználóbaráttá válhatna. A jelenleg használt mobiltelefonok rendelkeznek a magas felbontású fényképezés lehetőségével, mely összekapcsolódhat az adatfeldolgozó alkalmazással, szintén gyorsítva a folyamatot. Bemutatott munkánk célja egy olyan alkalmazás kifejlesztése és tesztelése volt, mely pontos és gyors képfeldolgozást tesz lehetővé, miközben könnyen kezelhető, felhasználóbarát, és melyet a későbbiekben akár mobiltelefonokra optimalizált fejlesztésként lehet folytatni. A végső cél egy olyan mobiltelefonos applikáció kifejlesztése lenne, mely az adatrögzítést (baktérium neve, hígítás, egyéb szükséges adatok) követően lehetőséget ad a Petri-csésze fényképezésére, és ezt követően a rajta látható telepeket megszámlálva kiírná a számolt értéket, anélkül, hogy a felhasználónak a képfeldolgozás bármely lépésébe bele kelljen avatkozni, ezzel jelentősen felgyorsítva a laboratóriumi munkálatokat, és lecsökkentve a vizsgálatok élőmunka igényét.

Anyag és módszer

A baktériumok és gombák tenyésztési folyamata

A Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék Bakteriológiai Laboratóriumának törzsgyűjteményéből végeztem kioltást, majd lefagyasztottam a törzseket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, és így tároltam felhasználásig. A tenyésztés és szélesztés folyamata összesen négy napot vett igénybe baktériumonként. A fajok kiválasztásakor figyelembe vettük, hogy milyen morfológiájú telepet képeznek (pl.: alak, szín, méret), illetve milyen táptalajon képesek növekedni (közönséges agar, véresagar, csokoládé agar, MacConkey agar, Sabouraud agar), ezzel variálva a telepek háttéréül szolgáló színviszonyokat. Arra voltunk kíváncsiak, hogy sötét és világos háttér előtt, különböző árnyalatú táptalajokon tenyésztett változatos telepmorfológiájú baktérium-, és gombafajok telepeinek számlálására is képes-e a program.

Első napon a mélyhűtött törzsekből szélesztettem megfelelő táptalajra bakteriológiai kacs segítségével, lamináris boxban. Második napon az itt kinőtt telepek egyikét továbboltottam egy második táptalajra, és szélesztettem. Ez a lépés egy esetleges más faj (szennyeződés) elszaporításának meggátlása miatt volt szükséges, így biztosan az általam választott baktérium-, vagy gombafaj került szaporításra. A harmadik napon a baktériumok TGE-levesbe lettek oltva (tripton: 5,0 g; glükóz: 1,0 g; élesztőkivonat: 2,5 g; agar: 10 g; víz: 1000 cm^3), majd 4, 6, vagy 12 óra múlva (előzetesen vizsgált inkubációs időt követően) készítettem el belőlük a hígítási sort. A levestenyészetben elszaporodott baktériumokkal és gombákkal végeztem el 3 párhuzamos tenyésztést a -3, -4, -5, -6-os hígításokból a megfelelő táptalajra. A hígítási sor első lépése: 9,9 ml fiziológiás konyhasóoldat mellé 0,1 ml baktériumszuszpenziót kevertem (-2. hígítás). A megfelelő homogenizálás után az így kialakított szuszpenzióból mértem 0,5 ml-t 4,5 ml fiziológiás konyhasóoldathoz (ezzel kialakítva -3. hígítást). Újabb 0,5 ml átmérésével létrehoztam a -4. hígítást, tovább ismételve a műveletet pedig a -5. és -6. hígításokat is. Ezek kellő homogenizációját követően -6. hígítástól kezdve $50\text{ }\mu\text{l}$ -t mértem hígításonként 3-3 táptalajra, és szélesztettem (előzetesen alkohollal történő, majd láng felett sterilizált) üvegbottal. Fajtól függően 24-48 órás inkubációt követően (negyedik nap) sor került a digitalizációra (mobiltelefonnal történő fényképezés), illetve a hagyományos módon történő (szabad szemmel, filctollal végzett) telepszámlálásra, és az így kapott adatok rögzítésére. A digitalizáció során törekedtem arra, hogy a telepeket azonos magasságból és megvilágítás mellett fényképezem.

A fajok kódolása

Minden kísérletben részt vevő baktériumfajt és gombát számkóddal jelöltem (a mélyhűtött törzsállomány-gyűjteménybe történő felvétel sorrendje szerint):

Actinobacillus equuli: 27; *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 18; *Aeromonas hydrophila*: 31; *Bacillus cereus*: 1; *Bibersteinia trehalosi*: 21; *Bordetella bronchiseptica*: 26; *Brucella ovis*: 22; *Candida albicans*: 28; *Clostridium perfringens*: 10; *Corynebacterium pseudotuberculosis*: 12; *Erysipelothrix rhusiopathiae*: 8; *Escherichia coli*: 13; *Glaesserella parasuis*: 17; *Histophilus somni*: 16; *Klebsiella pneumoniae*: 24; *Listeria monocytogenes*: 7; *Malassezia pachydermatis*: 29; *Paenibacillus larvae*: 2; *Pasteurella multocida*: 19; *Proteus mirabilis*: 25; *Pseudomonas aeruginosa*: 23; *Rhodococcus equi*: 9; *Salmonella enterica*: 14; *Serratia marcescens*: 15; *Staphylococcus hyicus*: 4; *Streptococcus agalactiae*: 5; *Trueperella pyogenes*: 11.

Minden rögzített felvételnek saját kódja van. Például a telepszámlálás mechanikájának szemléltetésére szolgáló kép kódja 24_-6_101_B, melyben az első számjegy jelöli a baktériumtörzset, a második szám a hígítási fokot (jelen esetben 10^{-6}), a harmadik számjegy az általam számolt telepek számát, végén „B” jelöli a fekete háttérrel (minden szélesztést dokumentáltunk fekete és fehér háttér előtt is, „B” és „W” jelölést kaptak).

Továbbá feltűnhet, hogy néhány szám kimaradt, nem rendeltünk hozzájuk baktérium vagy gomba törzset. Ennek többek között tenyésztési nehézségek, szennyeződés, stb. külső tényezők voltak az okai, így bizonyos fajok nem kerültek bele a végleges vizsgálatba.

A kísérletben részt vevő baktérium-, és gombafajok

A kísérletben részt vevő baktérium- és gombafajok, és rövid ismertetésük állategészségügyi szempontból, előfordulásukról, morfológiai, illetve tenyésztésbeli tulajdonságaikról:

Actinobacillus equuli: A lovak szórványosan, világszerte előforduló betegségét okozza, mely jelentkezhet az újszülött csikók vérfertőzéseként és a felnőtt lovak úgynevezett pyoseptikaemiájaként is. Az *A. equuli*t újabb két alfajba sorolják, az egyik az *A. equuli subsp. equuli*, a másik pedig az *A. equuli subsp. haemolyticus*, ez utóbbi véresagaron tenyésztve erős beta-haemolízist okoz. Mindkét alfajba tartozó törzsek természetes viszonyok között megtalálhatók a lovak orr-, száj-, és garatüregének nyálkahártyáján, a mandulákban és az emésztőcsatornában. Mivel mindegyik kórformát mindkét alfaj előidézheti, így nincs különbség patogenitásukban (Varga et al., 2018).

Actinobacillus pleuropneumoniae: A süldők és a felnőtt sertések heveny, lázas általános tünetekkel, légszomjjal, kifejezett nehézlégzéssel, vérzéses, elhalásos tüdő-, és fibrines mellhártyagyulladásal, jelentős elhullással járó betegségét okozza. Igényes baktérium, legjobban élesztőkivonatot és vért, valamint főtt vért tartalmazó táptalajokon tenyészhető. Két biotípusa van: az 1-es, amelybe tartozó törzsek a haemophilusokhoz hasonlóan NAD-ot igényelnek, ezek véresagaron *Staphylococcus aureus* telepek mellett fejlődnek a legjobban, míg a 2-es biotípusba tartozóknak NAD-ra nincs szükségük (Varga et al., 2018).

Aeromonas hydrophila: Fakultatív patogén, főleg a hidegvérűeket, alkalmanként halakat betegít meg, de szórványosan megtelepedhet a háziállatokban is. Könnyen tenyészhető, tenyésztési optimuma 28 °C, de nő 37 °C-on is. Telepei közönséges és véresagaron egyaránt nagyok, sárgásfehérek, véresagaron beta-haemolízist okoz (Tuboly et al., 1999).

Bacillus cereus: Talaj-, víz-, takarmány-, élelmiszer-, és környezeti minták vizsgálata során előforduló szaprofita, aerob spórás baktérium, véresagaron erős beta-haemolízist okoz. A *B. cereus* egyes törzsei azonban alacsony molekulatömegű enterotoxint képesek termelni. Ezek, ha a baktériumok élelmiszerekben, ételekben, általában szobahőmérsékleten történt tárolás következményeként nagyobb mértékben elszaporodnak, akkor emberekben hirtelen kialakuló, a szennyezett élelmiszerek elfogyasztását követő 6-24 órán belül gastrointestinális tüneteket okozhatnak (Varga et al., 2018).

Bibersteinia trehalosi: Fakultatív patogén, gyakran megtalálható a klinikailag tünetmentes különféle emlős- és madárfajok légutainak, emésztőcsatornájának, és nemi szerveinek nyálkahártyáján. Gram-negatív, coccoid vagy rövid pálcika alakú baktériumok. Véres agaron finom beta-haemolízist okoznak, felületükön vékony poliszacharid burok van. Kiskérődzők pasteurizálásainak előidézésében játszik szerepet ritkán önállóan, többnyire más fajokkal kombinálódva (Varga et al., 2018).

Bordetella bronchiseptica: Fakultatív patogén, természetes viszonyok között megtalálható a legtöbb háziállatfaj orrüregében, ritkábban felső légúti nyálkahártyáin. Sertésben rhinitist, a *P. multocida* törzsekkel együtt torzító orrgyulladást, esetenként tüdőgyulladást okozhat. Kutyaiban, és macskáiban önállóan vagy más vírusos betegségekhez társulva okoz megbetegedést. Továbbá házinyúl-állományokban náthás tüneteket, bronchitist, bronchopneumoniát okozhat. Rövid, pálcika alakú, Gram-negatív, obligát aerob baktériumok. Közönséges agaron, 48 óra alatt a virulens törzsek apró, domború, kerek, fénylő telepeket képeznek. A telepek néhány nap alatt megnagyobbodnak, szürkésfehér vagy porcelánfehér színűek lesznek (Tuboly et al., 1999).

Brucella ovis: Coccoid, rövid pálcika alakú baktériumok. 0,6-1,5 µm hosszú pálcikák, csillóik nincsenek, burkot nem képeznek. Obligát aerobok, 37 °C-on szaporíthatók. A szervekből, váladékokból való kitenyésztésükhöz 5-10% CO₂-ot tartalmazó légkört igényel. A *B. ovis* a kosok fertőző mellékhere- és heregyulladását, ritkán vemhes juhok vetélését idézi elő (Tuboly et al., 1999).

Candida albicans: Candidiasis, moniliasis, soor néven leírt humán- és állat-megbetegedéseket idézheti elő, de egészséges egyedekben is gyakran megtalálható. A gomba valódi és pseudomyceliumot, illetve jellegzetes clamidosporát is képez. Laboratóriumi gombatáptalajokon (pl. Sabouraud agar) a baktériumoktól némileg eltérő, rendszerint kenhető konzisztenciájú, tipikus élesztőszerű telepeket képeznek (Szigeti, 1997).

Clostridium perfringens: A patogén *Clostridium* fajok közül az egyetlen, amely nem csillós. Az állati testben és néha tenyészetekben is burkot képez. Közönséges agaron lapos, szürkésfehér színű, kerek vagy csipkézett szélű telepekben nő. Telepei véresagaron nagyobbak, körülöttük szennyesbarna színű haemolitikus zóna keletkezik. A *C. perfringens* A törzsek természetes előfordulási helye a talaj, a B, C, D és E törzsek viszont főleg a

bélcsatornában élnek, a talajban csak átmenetileg található meg. A *C. perfringens* törzsek a háziállatokban enterotoxaemiákat idéznek elő (Tuboly et al., 1999).

Corynebacterium pseudotuberculosis: Hajlott, 1-3 µm hosszú, bunkós végű, egyenetlenül festődő pálcikák, felületükön fimbriákkal. Közönséges agaron 37 °C-on, 48 óra elteltével apró, kerek, fehér telepeket képez, amelyek néhány nap múlva megnagyobbodnak, és sárgás színűek lesznek. Véresagaron a törzsek többsége beta-haemolízist okoz. Juhokban, kecskékben, elsajtosodással járó nyirokcsomó-gyulladást (pseudotuberculosis), lovakban fekélyes nyirokér-gyulladást, a mellkas és a has bőr alatti kötőszövetében tályogosodást okoz, de a nyirokcsomók és a nyirokerek gyulladásával, beolvadásával járó idült folyamatokat előidézhethet szarvasmarhában és szórványosan más állatfajokban is (Tuboly et al., 1999).

Erysipelothrix rhusiopathiae: Természetes viszonyok között megtalálható a sertés, szarvasmarha, juh, a házi- és vadon élő madarak emésztőcsatornájában, de előfordul a halakat és a puhatestűeket borító nyálkában, továbbá szennyvizekben, tavi iszapban is. Aerob, fakultatív anaerob, véresagaron 37 °C-on a virulens törzsek apró, harmatcseppszerű, fénylő S-telepeket képeznek. Az avirulens törzsek nagyobb, matt, egyenetlen szélű R-telepeket képeznek. Fakultatív patogén baktérium, leggyakrabban a sertést betegíti meg, de előfordul juhokban, házi- és vadon élő madarakban (főleg liba-, kacs- és pulykaállományokban) is (Tuboly et al., 1999).

Escherichia coli: Az *E. coli* baktériumok természetes viszonyok között megtalálhatók az ember és az állatok bélcsatornájában, ahol az aerob, fakultatív anaerob baktériumflóra részét képezik. Rendszerint körülcsillós, ritkán csilló nélküli, 2-3 µm hosszú pálcikák. Közönséges agaron, aerob és anaerob viszonyok között egyaránt, 24 óra alatt 1-2 mm átmérőjű telepeket képeznek. Az *E. coli* baktériumok fakultatív patogének, leggyakrabban a fiatal állatok megbetegedését okozzák (Tuboly et al., 1999).

Glaesserella parasuis: Korábbi nevén *Haemophilus parasuis*, csokoládéagaron 5-10% CO₂-ot is tartalmazó levegő jelenlétében tenyészhető. NAD-ot igényel. Fakultatív patogén, megtalálható az egészséges sertések orrüregében. Fiatal, 2-6 hetes malacokban a savóshártyák, az ízületek és esetenként az agyburok gyulladásával járó betegséget (Glässer-féle betegség) idéz elő (Tuboly et al., 1999).

Histophilus somni: Véresagaron is, de még jobban csokoládéagaron, 10% CO₂-ot is tartalmazó légtérben tenyészhető. Telepei 48 óra múltán is aprók, sárgás színűek.

Természetes viszonyok között előfordul a szarvasmarha urogenitalis nyálkahártyáin, bikákban főként a tasak nyálkahártyáján, nőivarúakban a hüvelyben, de előfordul a légutak nyálkahártyáján is, valamint megtalálható juhokban is. A *H. somni* fakultatív patogén, növedék és felnőtt szarvasmarhában tromboemboliás meningoencephalitist, légúti fertőzéseket, ízületgyulladást, a nemi szervekbe beszorodva reprodukciós zavarokat, borjakban elhúzódó tüdő- és ízületgyulladást idéz elő. Juhok közül kosokban mellékhere- és heregyulladást, anyajuhokban szórványosan vetélést, tőgygyulladást, bárányokban pedig septikaemiát és ízületgyulladást okozhat (Tuboly et al., 1999).

Klebsiella pneumoniae: Közöséges agaron és az enterobacteriumok tenyésztésére használt szelektív és differenciáló táptalajokon is tenyészhető. A törzstől és a táptalaj szénhidrátartalmától függően erősen domború, átlátszatlan, nyúlós, nyálkás telepeket képez. A *K. pneumoniae* a bélcsatorna természetes lakója. Saprophyta, illetve fakultatív patogén, alkalmanként azonban emberben légúti fertőzéseket, tüdőgyulladást, húgyúti fertőzéseket, az állatok közül pedig szarvasmarhában tőgygyulladást, lóban pedig metritist okoz. Gyakran kitenyészthetők klinikailag egészséges mének ondójából is (Tuboly et al., 1999).

Listeria monocytogenes: Rövid, pálcika alakú, csillós, Gram-pozitív baktériumok. Megtálálható a talajban, a természetes vizekben, a szennyvizekben, a növényzeten, földdel szennyezett, romlott szilázsokban, az egészséges emberek és állatok (szarvasmarha, juh, madarak stb.) bélcsatornájában, különféle élelmiszerekben, így pl. sertéshúsból készült nyers kolbászokban, nyers baromfihúsban, tejben. Közöséges agaron apró, kerek, kékesfehér fényű telepeket képez. Virulens törzseinek telepeit véresagaron keskeny beta-hemolitikus udvar övezi. Fakultatív patogén, megbetegítheti az embert, valamint fogékony az összes házi- és vadon élő emlős és a madarak is. Főleg a fiatal állatokat, közülük is elsősorban a juhot, a szarvasmarhát, a nyulat, egyéb prémesállatokat és a baromfifajokat is megbetegíti (Tuboly et al., 1999).

Malassezia pachydermatis: Gyakran kitenyészhető egészséges kutyák és macskák bőréből, valamint külső hallójáratából. *Malassezia* élesztőgomba jelenléte esetén erythematous-ceruminosus típusú OE alakul ki. Az élesztősejtek palack, vagy kuglibábú formájúak, átlagosan 3-5 µm nagyságúak. Telepeik Sabouraud agaron 37 °C-on két nap alatt fejlődnek ki (Kiss & Papp, 1994).

Paenibacillus larvae: Pálcika alakú, Gram-pozitív, aerob, spórás, csillós baktériumok. Természetes előfordulási helyük a talaj, de megtalálhatók a levegőben, a természetes vizekben, a növényzeten. A *P. larvae* a mézelő méhek nyúlós (amerikai) költésrothadását okozza (Tuboly et al., 1999).

Pasteurella multocida: Apró, 0,5-2 µm átmérőjű, coccoid alakú baktériumok, vagy rövid pálcák, csillóik nincsenek, spórát nem képeznek. Gram-negatív, aerob, fakultatív anaerob baktériumok, a táptalajok iránt igényesek. A *P. multocida* véresagaron nem okoz haemolízist, az emlősökből kitenyésztett virulens *P. multocida* törzsek egy része azonban erősen nyálkás, nyúlós (mukoid) telepeket képez. A *pasteurellák* fakultatív patogének, a törzsek virulenciája azonban tág határok között változik. A virulens *P. multocida* törzsek, főleg az A, kisebb részben a D buroktípusba tartoznak. Szarvasmarhában, juhban, kecskében, ritkán állatkerti és vadon élő kérődzőkben bronchopneumoniát, esetenként septikaemiát, mastitist, stb. okoz. Sertésben szórványosan pneumoniát, nyulakban náthával, orrfolyással járó tüneteket, bronchopneumoniát, tüdőgyulladást, septikaemiát idéz elő. A baromfifajokban (főleg kacsában, libában, pulykában) pedig heveny septikaemiával járó baromficholerát okoz. Sertésben a citotoxinokat termelő D buroktípusú törzsek idézik elő a torzító orrgyulladást. A *P. multocida* gyakran másodlagos kórokozóként társul különféle légúti vírusos betegségekhez (Tuboly et al., 1999).

Proteus mirabilis: Az ember és az állatok bélcsatornájának természetes lakói, megtalálhatók azonban szennyvízben, rothadó anyagokban is. Az aerob rothasztók fő képviselői. Körülcillósak, élénken rajzanak, a nedves táptalajok felületét leheletszerű, vékony rétegben benövik. A *Proteus* nemzetség tagjai saprophyták, kórfolyamatokban ritkán vesznek részt, akkor is csupán másodlagos szereppel bírnak (Tuboly et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa: Igen széles körben elterjedt baktérium, megtalálható a természetes vizekben, szennyvizekben, a talajban, a növényzeten, de alacsony számban az emlősök és a madarak bélcsatornájában, valamint alkalmanként a bőrön is. Egyetlen csillója van, amellyel élénken mozog. Levegő jelenlétében bármely táptalajon, 5-42 °C között szaporodik, de szaporodási maximuma 37 °C-on van. Gyorsan és bőségesen szaporodik, nedves, lapos, sima szélű telepeket képez. Véresagaron beta-haemolízist okoz. Fakultatív patogén, megbetegítheti valamennyi állatfajt és az embert is (Tuboly et al., 1999).

Rhodococcus equi: 1-3 µm méretű polimorf baktériumok. Aerob, közönséges agaron is jól szaporodik, 24-48 óra alatt apró, áttetsző, cseppszerű, nyálkás telepeket képeznek, amelyek néhány nap múlva megnagyobbodnak, sűrű tenyészetben gyakran össze is folynak, s pigmenttermelésük következtében rózsaszínűek (lazacszínűek). Természetes előfordulási helye a talaj, a növényevő állatok trágyája, ritkán a ló, szarvasmarha, juh, sertés emésztőcsatornája. Fiatal, 1-4 hónapos csikókban okoz tályogképződéssel járó bronchopneumoniát, ritkábban a bélfal és a bélfodri nyirokcsomók gennyes gyulladását, de megbetegítheti a szarvasmarhát, a sertést és az immunszuppresszióknak kitett embert is (Tuboly et al., 1999).

Salmonella enterica: A salmonellák patogén vagy fakultatív patogén baktériumok. Egyes szerotípusok kizárólag emberi kórokozók, legtöbbjük azonban egyaránt képes megbetegíteni az embert és az állatokat is, illetve van néhány szerotípus, amely gyakorlatilag csak az állatokat betegíti meg. Egyszerű táptalajokon is jól szaporodnak és a többi enterobacteriumhoz hasonló telepeket képeznek (Tuboly et al., 1999).

Serratia marcescens: Megtalálhatók a talajban, a vízben, a szennyvizekben, ritkábban az ember és az állatok bélcsatornájában. Főleg 30 °C alatt, vízben nem oldódó, vörös; vagy vízben oldódó, így a környezetet is elszínező rózsaszínű pigmenteket termelnek. Saprophyta, megtalálható élelmiszerekben (sajtokban és más tejtermékekben stb.). Alacsony (4-5 °C) hőmérsékleten is képesek szaporodni, ezért hűtőszekrényben tárolt élelmiszerek megromlását is előidézhetik (Tuboly et al., 1999).

Staphylococcus hyicus: Gram-pozitív, gömb alakú baktériumok. Megtalálhatók az ember és az állatok bőrén, a felső légutakban, az urogenitális szervek nyálkahártyáján, valamint az emésztőcsatornában. 1 µm átmérőjű, szabályos gömb vagy kissé ovális alakú baktériumok. Csillójuk, spórájuk nincs, burkot nem képeznek. Igénytelen, aerob, fakultatív anaerob baktériumok. Közönséges agaron, 37 °C-on tenyésztve, 1-3 mm átmérőjű, kerek, fénylő, domború, kenhető konzisztenciájú telepeket képeznek. Véresagaron a patogén törzsek rendszerint erős haemolízist okoznak. A *S. hyicus* sertésben exsudatív bőrgyulladást okoz (Tuboly et al., 1999).

Streptococcus agalactiae: Gram-pozitív, gömb alakú, folyékony táptalajokban tenyésztve gyakran hosszabb-rövidebb láncokat formáló baktériumok. Aerobok, fakultatív anaerobok, kitenyésztésükre legalkalmasabbak a glükózt, vérsavót vagy vért is tartalmazó táptalajok. A

tőgygyulladások előidőzésében leggyakrabban szerepet játszó baktériumok egyike (Varga et al., 2018).

Trueperella pyogenes: Egyenes vagy kissé hajlott 0,5-2 μm hosszú pálcikák. Véresagaron, 37 °C-on, levegő jelenlétében 1-2 nap alatt apró, tűszúrásnyi telepeket képez. A telepek körül beta-haemolízis látható. A *T. pyogenes* a különféle állatfajok nyálkahártyáinak a természetes lakója, sertésben, szarvasmarhában, juhban, kecskében gennyesedéssel járó helyi folyamatokat (sebfertőzést, csülökbántalmakat, ízületgyulladást, köldökgyulladást, méhgyulladást, mellékhere- és heregyulladást stb.) okoz. Továbbá gennyes, elhalásos, tályogképződéssel járó tüdőgyulladást, tőgygyulladást, esetenként septikaemiát, a magzatokba jutva pedig vetélést idéz elő. Alkalmanként izolálható lovak, baromfi, ritkábban más állatfajok tályogosodással járó folyamataiból is. Ritkán megbetegítheti az embert is (Tuboly et al., 1999).

Képfeldolgozás

A vizsgálatokban az EBImage R-csomag függvényeit használtuk (Pau et al., 2010). A képfeldolgozás lépései:

1. lépés (1. ábra):

```
library(EBImage)
f = '24_-6_101_B.jpg'
kep = rotate(readImage(f),90)
```

2. lépés (2. ábra):

```
telepek1 = getFrame(kep, 2)
```

3. lépés (3. ábra):

```
th = 36
telepek2 = thresh(telepek1, w=th, h=th, offset=0.001)
```

4. lépés (4. ábra):

```
telepek3 = opening(telepek2, makeBrush(th+1, shape='disc'))
telepek3 = opening(telepek3, makeBrush(th+1, shape='box'))
```

5. lépés (5. ábra):

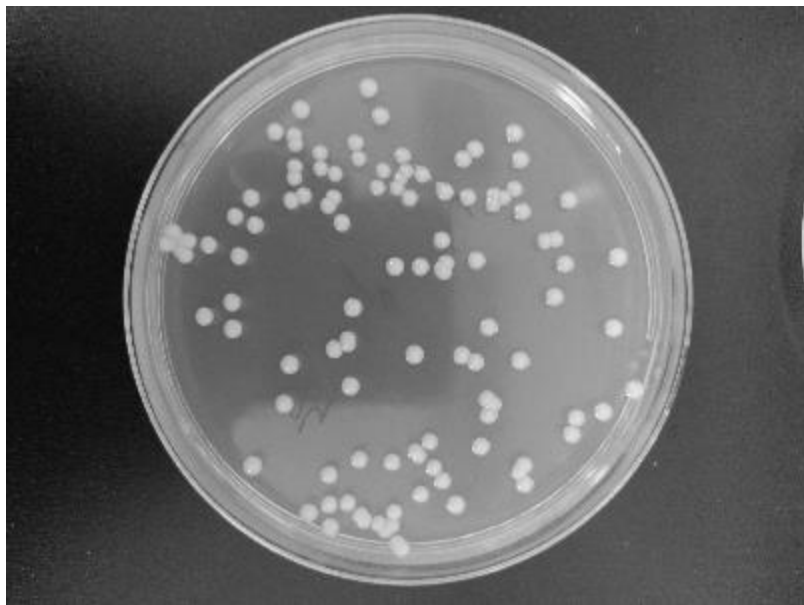
```
telepek4 = fillHull(telepek3)
```

6. lépés:

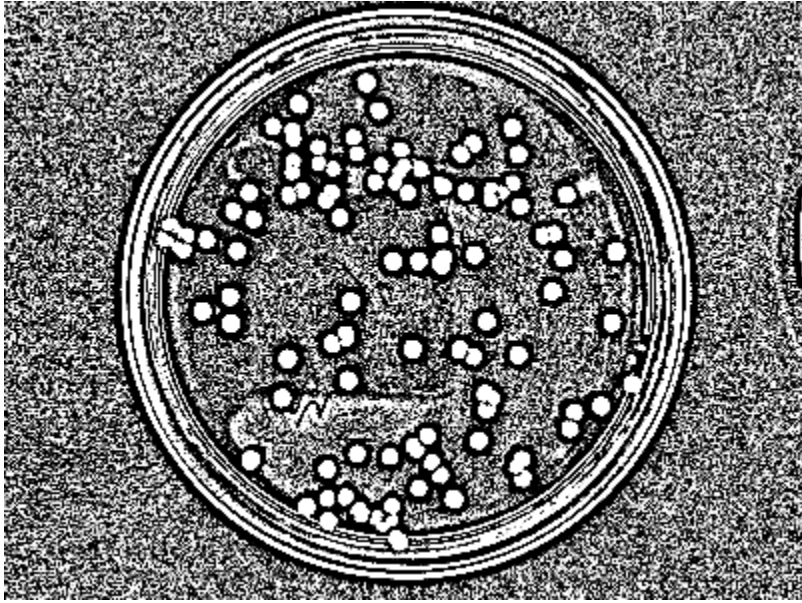
```
telepek5 = bwlabel(telepek4)
max(telepek5)
[1] 101
```



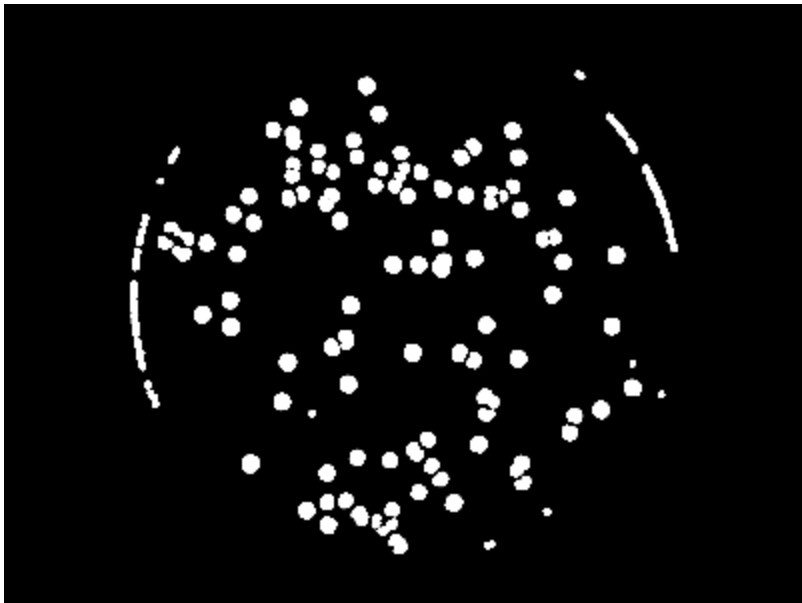
1. ábra: 1. lépés



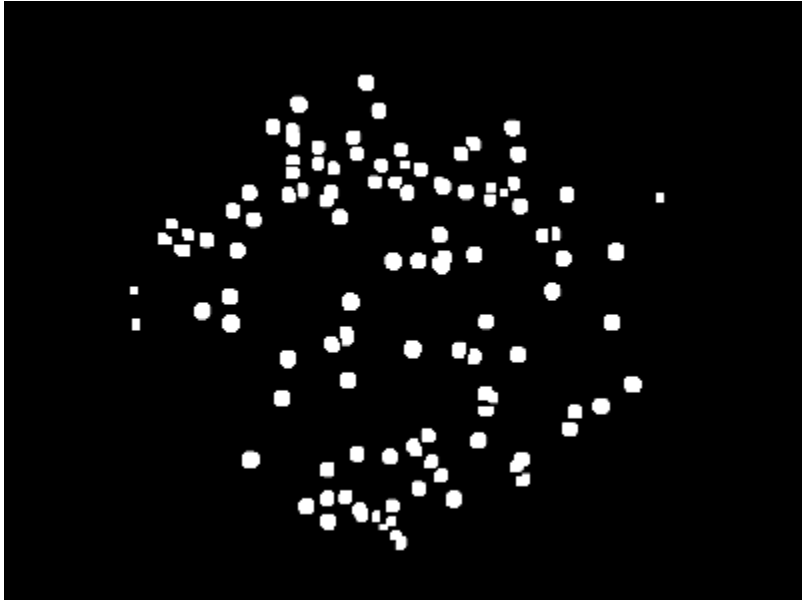
2. ábra: 2. lépés



3. ábra: 3. lépés



4. ábra: 4. lépés



5. ábra: 5. lépés

Határérték paraméter

Szükséges volt meghatározni minden törzs esetében azt a küszöbérték/határérték (threshold) paramétert, amely alkalmazásakor az algoritmus által számolt, és az általam leszámolt érték közötti relatív eltérés a lehető legalacsonyabb. Ez egy szélesség és hosszúság paraméter, illetve ettől lehetséges minimális eltérés számszerű rögzítése a programban. Ez a következőképp fest R környezetben:

```
library(EBImage)
paths = list.files(pattern='.jpg$')
ths = seq(10, 40, by=2)
res.lst = list()
for(f in paths){
  v = c()
  for(th in ths){
    kep = rotate(readImage(f),90)
    telepek = getFrame(kep, 2)
    telepek = thresh(telepek, w=th, h=th, offset=0.001)
    telepek = opening(telepek, makeBrush(th+1, shape='disc'))
    telepek = opening(telepek, makeBrush(th+1, shape='box'))
    telepek = fillHull(telepek)
    telepek = bwlabel(telepek)
    v = c(v, max(telepek))
  }
  res.lst[[length(res.lst)+1]]=v
}
```

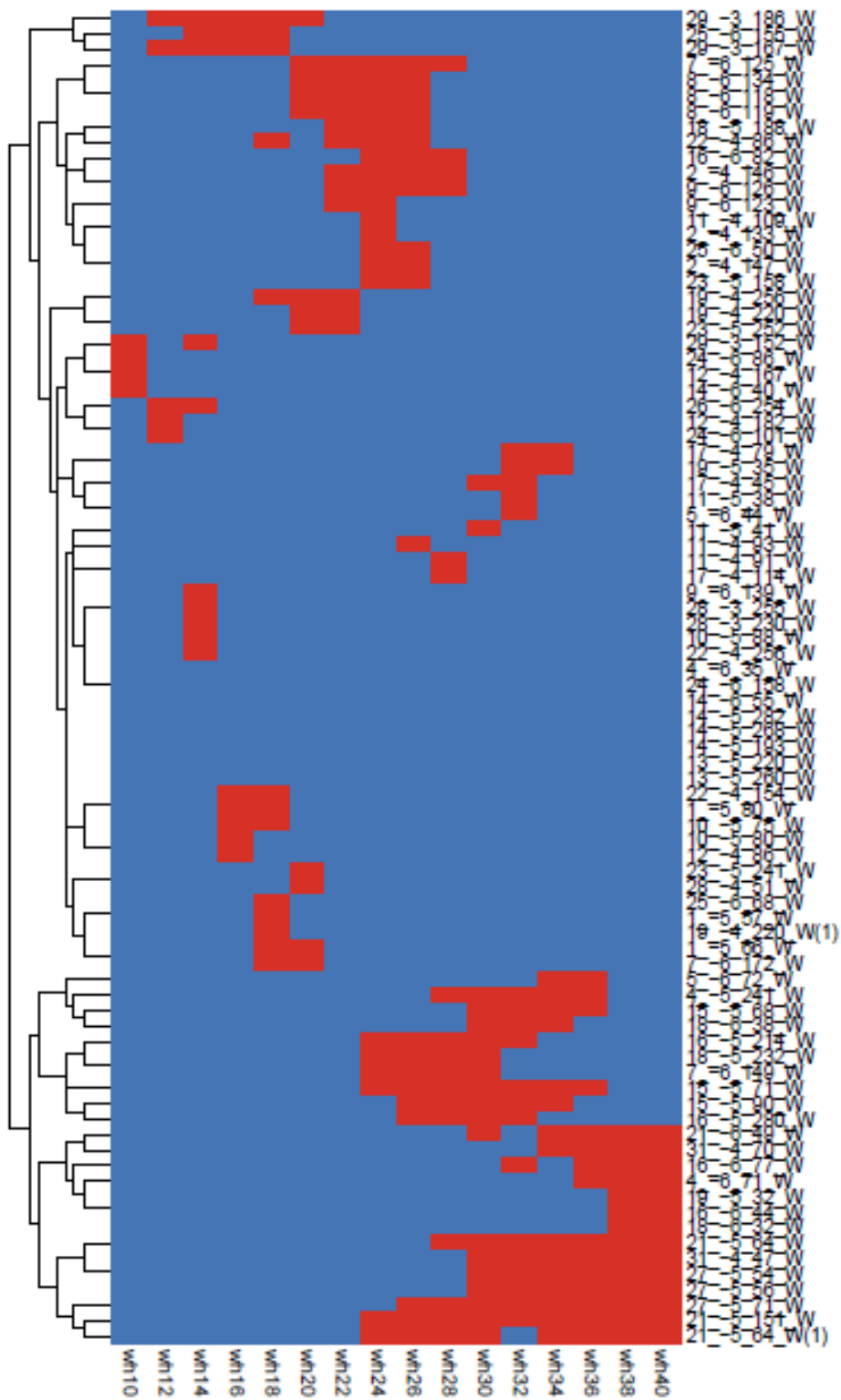
Eredmények

Célunk a kísérlet során az volt, hogy a fent felsorolt és ismertetett törzsekre határkeresés metodikával találjuk meg azt a határérték paramétert, amivel az algoritmus a lehető legpontosabban képes megszámlálni a képeken látható telepeket összevetve az általam számoltakkal. Minden faj esetében megvizsgáltuk, hogy melyik határérték paraméter mellett az algoritmus mennyi telepet képes megszámlálni, és így ki tudtuk választani azokat a határértékeket, ahol a relatív hiba a legkisebb volt (1. táblázat).

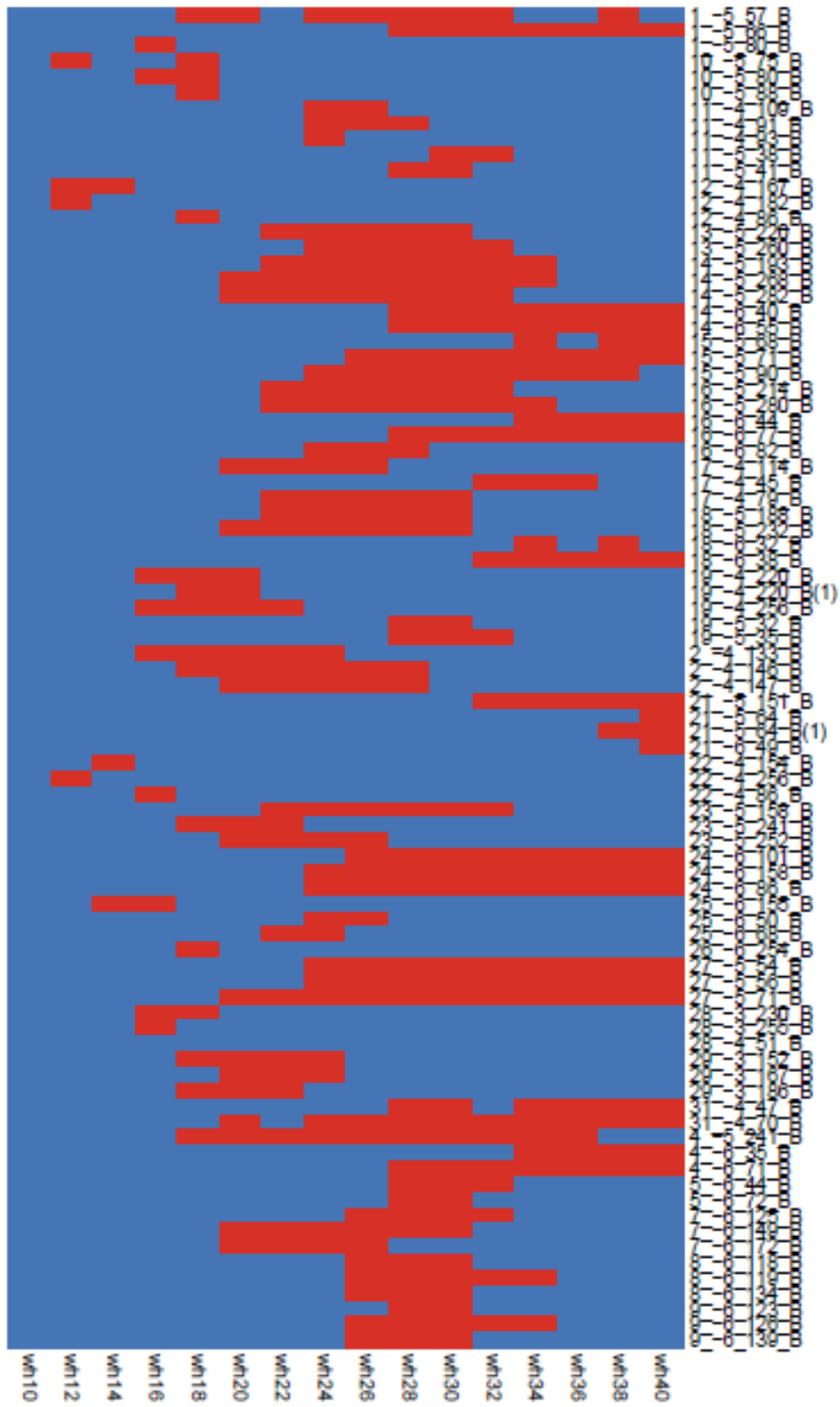
Faj	Határérték	Relatív hiba (%)
1	28	1.8
2	20	2.3
4	32	1.4
5	28	2.8
7	26	2.0
8	30	3.4
9	28	0.7
10	12	1.3
11	26	1.1
12	12	1.1
13	26	9.2
14	32	2.5
15	36	0.0
16	34	1.3
17	26	1.3
18	22	1.7
19	28	0.0
21	38	0.7
22	16	3.5
23	22	0.4
24	36	0.0
25	24	0.0
26	18	2.0
27	34	0.0
28	24	21.6
29	20	5.6
31	38	0.0

1. táblázat: A legkisebb relatív eltérést eredményező határértékek, fajonként.

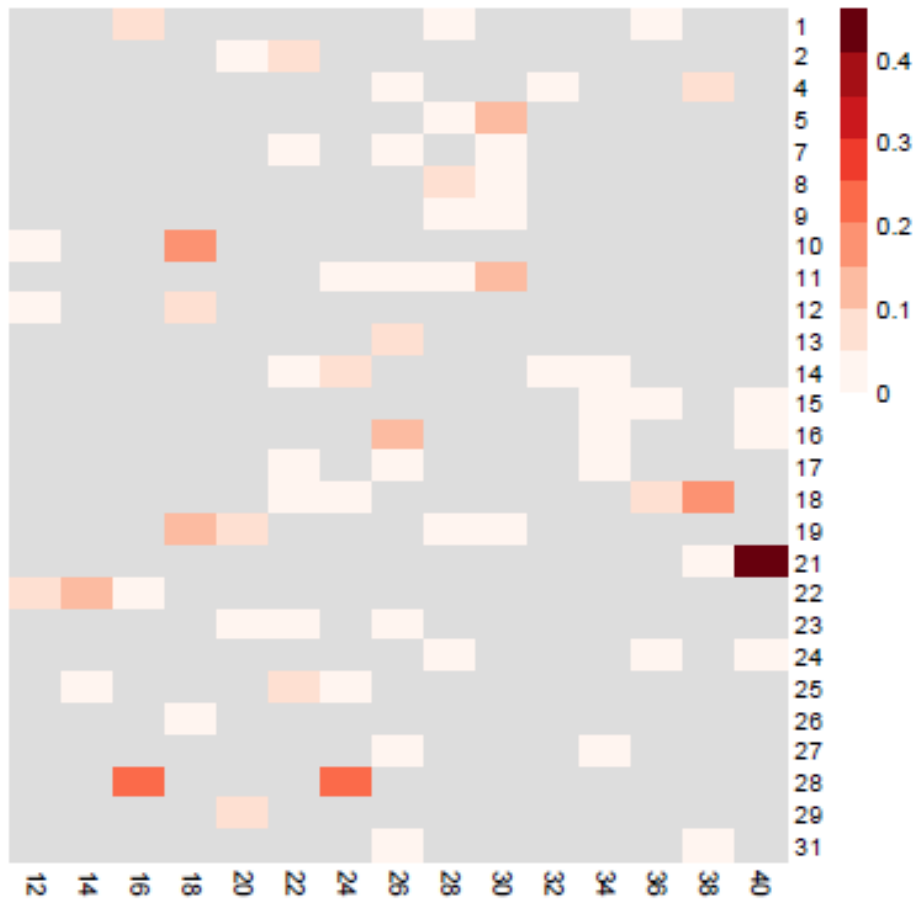
6 alkalomtól eltekintve a relatív hiba 2,5% alatti volt. Továbbá a kísérlet során észrevettük, hogy fekete háttéren fényképezett Petri-csészék pontosabb eredményt adnak, így a kísérletet azokkal folytattuk (6-7-8. ábra). Megállapítható, hogy a fehér háttér nem alkalmas határérték-keresésre ezzel a módszerrel.



6. ábra: A leszámrláshoz viszonyított eltérés kisebb vagy nagyobb, mint 20%, fehér háttér.



7. ábra: A leszámrláláshoz viszonyított eltérés kisebb vagy nagyobb, mint 20%, fekete háttér.



8. ábra: Fekete háttér, fajonkénti relatív eltérés a leszámpláláshoz képest.

A részletes eredményeket az 2. táblázat szemlélteti. Ebben megtalálhatóak: minden faj sorszáma, azon hígítási fok, amelynél a leszámolt érték 30 és 300 közé esik, a hozzá tartozó leszámplált érték, és az algoritmus által kalkulált számadat, mindez már csak a fekete háttérű képeket felhasználva.

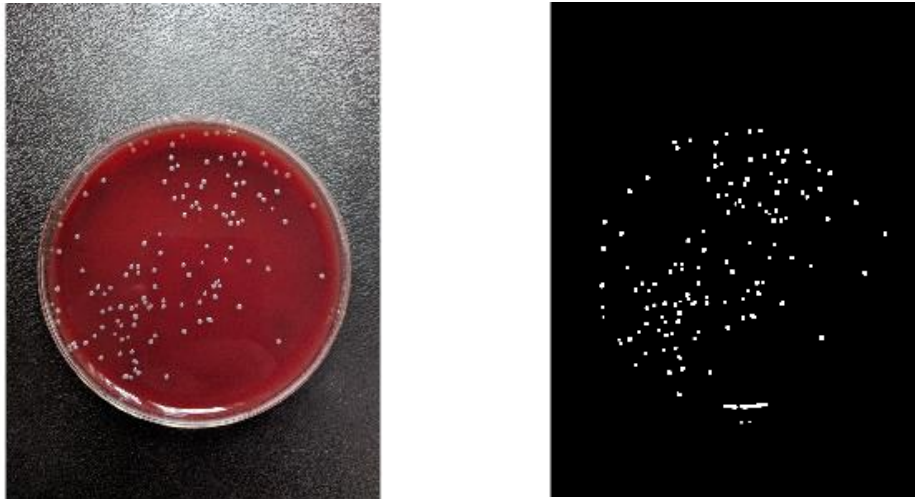
Faj	Hígítás	Leszámlálás	Algoritmus
1	-5	57	37
1	-5	66	54
1	-5	80	28
2	-4	133	124
2	-4	146	143
2	-4	147	159
4	-5	241	209
4	-6	35	41
4	-6	71	71
5	-6	44	47
5	-6	72	63
7	-6	125	139
7	-6	149	145
7	-6	172	140
8	-6	118	92
8	-6	119	110
8	-6	134	109
9	-6	123	117
9	-6	126	121
9	-6	139	128
10	-5	75	59
10	-5	80	94
10	-5	88	151
11	-4	109	75
11	-4	91	82
11	-4	93	61
11	-5	38	54
11	-5	41	45
12	-4	167	127
12	-4	182	125
12	-4	86	219
13	-5	220	196
13	-5	260	230
14	-5	193	156
14	-5	268	216
14	-5	282	238
14	-6	40	38
14	-6	55	55
15	-5	68	76
15	-5	71	68
15	-5	90	78
16	-5	214	159
16	-5	280	218
16	-6	44	46
16	-6	77	75
16	-6	82	53
17	-4	114	93
17	-4	45	62
17	-4	79	77

18	-5	188	186
18	-5	232	225
18	-6	32	65
18	-6	38	58
19	-4	220	74
19	-4	256	124
19	-5	32	31
19	-5	35	37
21	-5	151	146
21	-5	64	75
21	-6	49	68
22	-4	154	61
22	-4	256	81
22	-4	86	60
23	-5	158	174
23	-5	241	184
23	-5	252	238
24	-6	101	101
24	-6	158	137
24	-6	86	84
25	-6	155	88
25	-6	50	38
25	-6	68	41
26	-6	254	190
27	-5	54	54
27	-5	56	48
27	-5	71	67
28	-3	230	20
28	-3	255	12
28	-4	51	36
29	-3	152	143
29	-3	167	160
29	-3	186	185
31	-4	47	44
31	-4	70	60

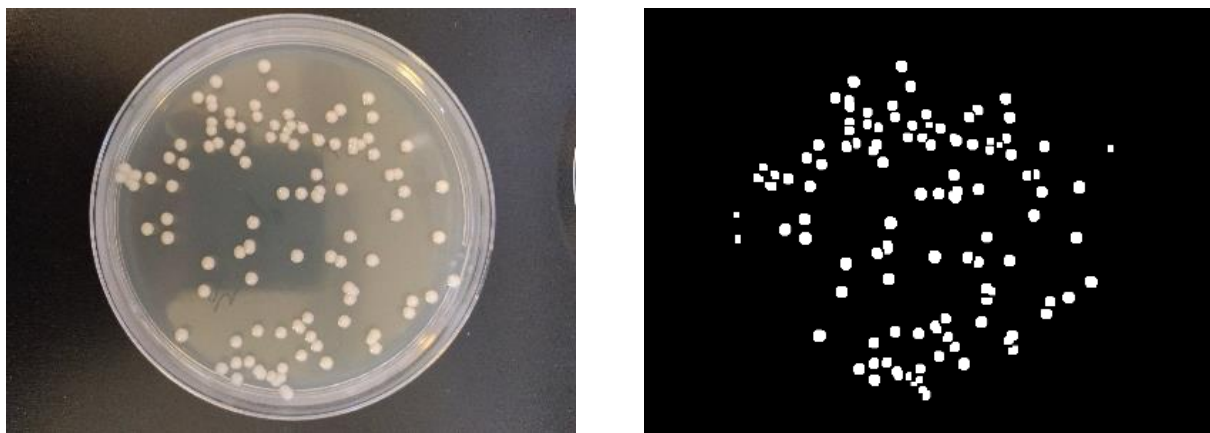
2. táblázat: A fajra meghatározott legkisebb hibájú határértékkal becsült és a leszámlálással kapott CFU-értékek.

Megbeszélés

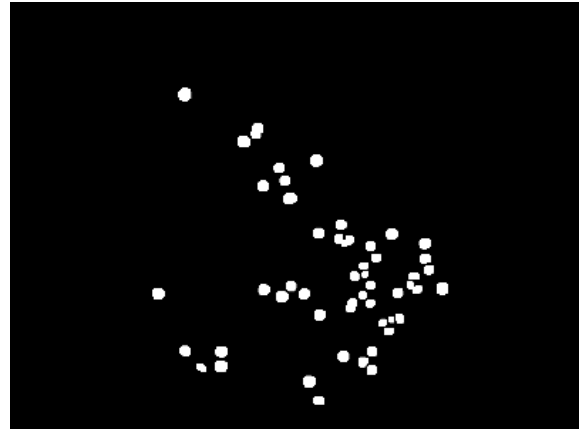
Számos alkalommal előfordult, hogy az algoritmus a képen szereplő telepeket helyesen felismerte és megszámlolta, így az általa produkált eredmény azonos / közel azonos lett a leszámolt adattal (9-10-11. ábra).



9. ábra: 2_-4_133_B



10. ábra: 24_-6_101_b

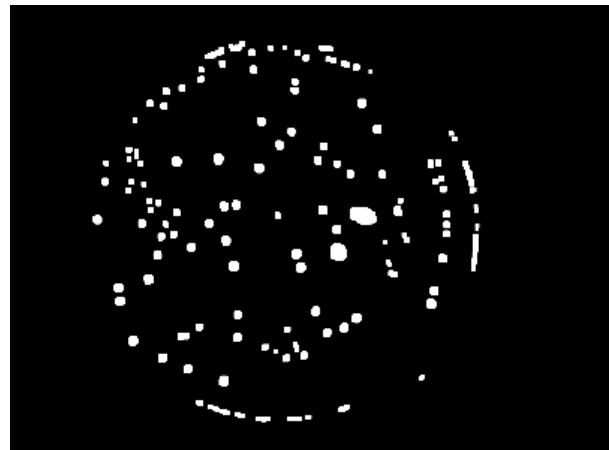
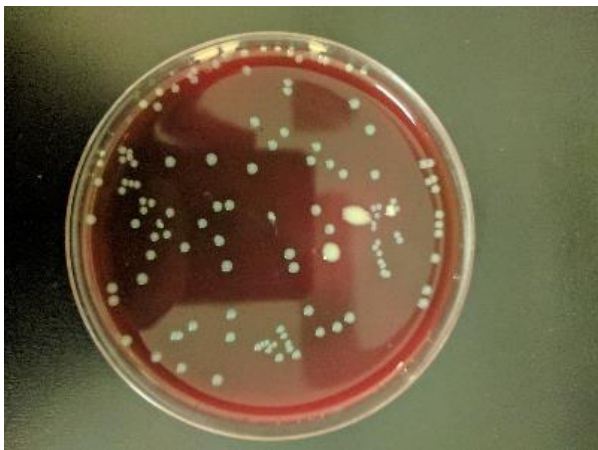


11. ábra: 27_-5_56_B

A kísérlet korlátait a következőkben szeretném ismertetni:

A leggyakrabban előforduló hiba, amely a kézi számlálás és az algoritmus által produkált érték közötti legnagyobb különbséget eredményezi, az a Petri-csésze oldalán tükröződő fénysáv. Valamilyen szinten a legtöbb kép esetében hibaforrásként szolgált.

Leggyakrabban két módon vezette félre az algoritmust: bizonyos esetben megtévesztő eredményt kaptunk, hiszen látszólag az algoritmus számadata közel azonos a leszámolt számmal, de ezt nem csak a telepek számából kapta, hanem hibásan a csésze oldalának csillogását is értéként vette. Véletlenszerűen a számadatok egyezhetnek ekkor is (12-13. ábra).



12. ábra: 9_-6_126_B



13. ábra: 18_-5_188_B

Előfordult, hogy bár az algoritmus helyesen felismerte és megszámlolta a telepeket, a végeredménybe beleszámolta az általa telepnek vélt műterméket is, így nagyobb értéket eredményezve a leszámoltnál (14. ábra).

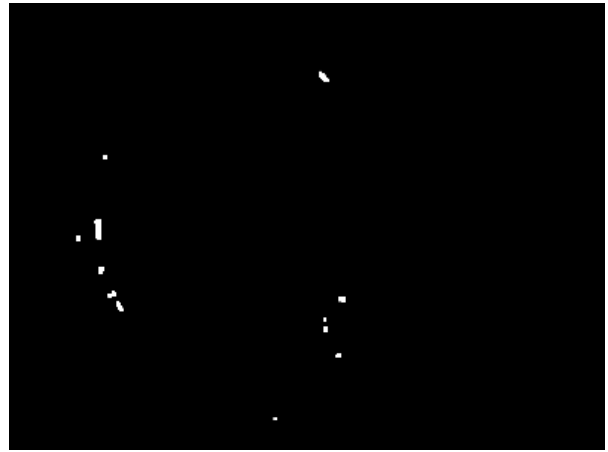


14. ábra: 17_-4_45_B

A következő hibaforrás abból adódott, hogy a táptalajon képződő telepek annyira aprók voltak, hogy az algoritmus képtelen volt felismerni őket (15-16. ábra), vagy azokat csak részben sikerült felismerni, így kihagyva a képződött telepek egy részét a végeredményből (17-18. ábra).



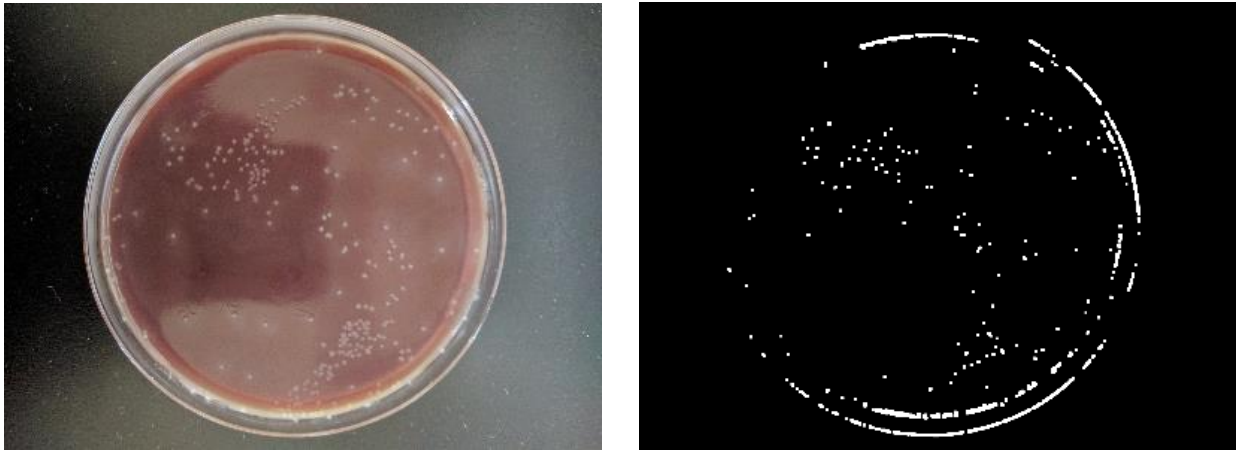
15. ábra: 22_-4_256_B



16. ábra: 28_-3_255_B



17. ábra: 17_-4_114_B



18. ábra: 26_-6_254_B

Néhány esetben a fentiekkel ellentétben a magas telepszámú hígítások alkalmával a szorosan egymás mellett helyezkedő telepeket egyként értelmezte a program, így azokat egybe számolva kevesebbet mutatott ki a leszámoltnál (19. ábra).



19. ábra: 4_-5_241_B

Összefoglalás

A digitális-, és az információtechnológiai fejlődés számos területen segíti az orvosi, állatorvosi tevékenységet. Az állatorvosi bakteriológia, infektológia és élelmiszer mikrobiológia területén is sok esetben szükség van egy mintában vagy levestenyészetben az élőcsíraszám meghatározásra, mely meglehetősen munka-, és időigényes folyamat. A bemutatott munkánk célja egy olyan digitális módszer kifejlesztése és tesztelése, mely segítséget nyújthat a baktérium levestenyészetek élőcsíraszámának meghatározásában, ezzel jelentősen megkönnyítve és felgyorsítva a laboratóriumban dolgozók munkáját.

A kutatásunkhoz kiválasztottunk 25 olyan baktériumfajt (Gram-pozitív, Gram-negatív, aerob és anaerob fajok), illetve 2 gombafajt, amelyek által okozott kórfolyamatok jelentős gazdasági kártételt okoznak a gazdasági haszonállat tartásban, de egyesek betegségeket okozhatnak a kedvtelésből tartott állatokban is. A fajok kiválasztásakor figyelembe vettük, hogy milyen morfológiájú telepet képeznek (pl.: alak, szín, méret), illetve milyen táptalajon képesek növekedni (közönséges agar, véresagar, csokoládé agar, MacConkey agar, Sabouraud agar). Az adott baktériumtörzsből tízes alapú hígítási sort készítettünk, majd három párhuzamos szélesztést végeztünk a 10^{-3} - 10^{-6} közötti hígításokból. A tenyésztések digitalizálására (fényképezésére) 24-48 órás inkubációt követően került sor. Ezt követően a táptalajok felületén kifejlődött telepeket a hagyományos módon (szabad szemmel) megszámloltuk, és a kapott eredményeket rögzítettük.

A digitális képelemzést R-környezetben végeztük, az EBImage-csomag segítségével. A különböző baktériumoknak, hígításoknak és táptalajoknak a telepek automatizált azonosításra gyakorolt befolyásoló hatásának vizsgálata céljából nagyszámú futtatást hajtottunk végre. Ezek során a telepazonosításhoz használt függvények paramétereit szisztematikusan változtattuk.

A hagyományos módon, és az általunk kifejlesztett R-kód által számolt végeredmények közötti relatív eltérés 0% és 2,5% között volt (6 törzset leszámítva). A következő eredményeket kaptuk: *Actinobacillus equuli*: 0,0% (relatív hiba); *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 1,7%; *Aeromonas hydrophila*: 0,0%; *Bacillus cereus*: 1,8%; *Bibersteinia trehalosi*: 0,7%; *Bordetella bronchiseptica*: 2,0%; *Brucella ovis*: 3,5%; *Candida albicans*: 21,6%; *Clostridium perfringens*: 1,3%; *Corynebacterium pseudotuberculosis*: 1,1%; *Erysipelothrix rhusiopathiae*: 3,4%; *Escherichia coli*: 9,2%;

Glaesserella parasuis: 1,3%; *Histophilus somni*: 1,3%; *Klebsiella pneumoniae*: 0,0%;
Listeria monocytogenes: 2,0%; *Malassezia pachydermatis*: 5,6%; *Paenibacillus larvae*:
2,3%; *Pasteurella multocida*: 0,0%; *Proteus mirabilis*: 0,0%; *Pseudomonas aeruginosa*:
0,4%; *Rhodococcus equi*: 0,7%; *Salmonella enterica*: 2,5%; *Serratia marcescens*: 0,0%;
Staphylococcus hyicus: 1,4%; *Streptococcus agalactiae*: 2,8%; *Trueperella pyogenes*: 1,1%.

A vizsgálataink eredményeként sikerült kifejleszteni egy olyan R-kódot, melynek segítségével csökkenthető a telepszámolás élőmunka igénye, amellet, hogy a hagyományos módon számolt értékeket szinte tökéletesen képes reprodukálni.

Summary

Development and test of a new digital imaging technique for the determination of viable cell count of different bacterial and fungal broth cultures with veterinary importance

Advances in digital- and information technology assist medical and veterinary activities in many areas. In several cases in the field of veterinary bacteriology, infectious and food microbiology there is also a need to determine the number of live bacteria in a sample or the viable cell count in a broth culture, which is a rather labour-intensive and time-consuming process. The aim of our work presented is to develop and test a digital method that can provide aid in determining the viable bacterial cell count of broth cultures, thus greatly simplifying and speeding up the laboratory work.

We selected 25 bacterial species (gram-positive, gram-negative, aerobic and anaerobic species) and 2 fungal species that cause diseases inducing significant losses to economic livestock keeping, while some may also cause illnesses in pets. When selecting the species, we have taken into account the colony morphology (eg.: shape, colour, size) and kind of growth medium they can develop in (nutrient agar, blood agar, chocolate agar, MacConkey agar, Sabouraud agar). Tenfold dilution were prepared from the bacterial broth cultures and three parallel platings were performed from dilutions of 10^{-3} - 10^{-6} . The cultures were digitized (photographed) after 24 to 48 hours of incubation. The colonies developed on the surface of the culture media were then counted using conventional method (with naked eye) and recorded.

Digital image analysis was done in R-environment using the EImage package. Numerous runs were performed to assess the influence of a variety of bacterium species, dilution rate and media on automated identification. In these, the parameters of the functions used for colonial identification were systematically changed.

The relative deviation between the final results reported in the traditional way and the R-code we developed was between 0% and 2.5% (except for 6 species). The following results were obtained:

Actinobacillus equuli: 0.0% (relative error); ***Actinobacillus pleuropneumoniae***: 1.7%;
Aeromonas hydrophila: 0.0%; ***Bacillus cereus***: 1.8%; ***Bibersteinia trehalosi***: 0.7%;
Bordetella bronchiseptica: 2.0%; ***Brucella ovis***: 3.5%; ***Candida albicans***: 21.6%;

Clostridium perfringens: 1.3%; *Corynebacterium pseudotuberculosis*: 1.1%; *Erysipelothrix rhusiopathiae*: 3.4%; *Escherichia coli*: 9.2%; *Glaesserella parasuis*: 1.3%; *Histophilus somni*: 1.3%; *Klebsiella pneumoniae*: 0.0%; *Listeria monocytogenes*: 2.0%; *Malassezia pachydermatis*: 5.6%; *Paenibacillus larvae*: 2.3%; *Pasteurella multocida*: 0.0%; *Proteus mirabilis*: 0.0%; *Pseudomonas aeruginosa*: 0.4%; *Rhodococcus equi*: 0.7%; *Salmonella enterica*: 2.5%; *Serratia marcescens*: 0.0%; *Staphylococcus hyicus*: 1.4%; *Streptococcus agalactiae*: 2.8%; *Trueperella pyogenes*: 1.1%.

As a result of our investigations, an R-code was developed that could reduce the need of workload for colony counting, beside the fact that it is able to almost perfectly reproduce the values calculated in the traditional way.

Irodalomjegyzék

- Bewes, J.M., Suchowerska, N., McKenzie, D.R., 2008: Automated cell colony counting and analysis using the circular hough image transform algorithm (CHiTA). *Physics in Medicine and Biology*, 53, 5991-6008.
- Brugger, S.D., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., 2012: Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS ONE*, 7, e33695.
- Cai, Z., Chattopadhyay, N., Liu, W.J., Chan, C., Pignol, J.P., 2011: Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: comparison with manual counting. *International Journal of Radiation Biology*, 87, 1135-1146.
- Clarke, M.L., Burton, R.L., Hill, A.N., Litorja, M., Nahm, M.H., 2010: Lowcost, highthroughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77A, 790-797.
- Costa, C.M., Yang, S., 2009: Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software. *Annals of Botany*, 104, 1005-1010.
- Forero, M.G., Pennack, J.A., Hidalgo A., 2010: DeadEasy neurons: automatic counting of HB9 neuronal nuclei in Drosophila. *Cytometry Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77, 371-378.
- Geissmann, Q., 2013: OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects. *PLoS ONE*, 8(2), e54072.
- Kachouie, N.N., Kang, L., Khademhosseini, A., 2009: Arraycount, an algorithm for automatic cell counting in microwell arrays. *BioTechniques*, 47, 10-16.
- Kiss G., Papp L., 1994: A *Malassezia pachydermatis* okozta kórképek diagnosztikája és gyógykezelése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 49, 745-748.
- Mansberg, H.P., 1957: Automatic particle and bacterial colony counter. *Science*, 126, 823-827.

- Mello, C.A.B., dos Santos, W.P., Rodrigues, M.A.B., Candeias, A.L.B., Gusmo, C.M.G., 2008: Image segmentation of ovitraps for automatic counting of *Aedes Aegypti* eggs. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference 2008*, 3103-3106.
- Mukherjee, D.P., Pal, A., Sarma, S., Majumder, D., 1995: Bacterial colony counting using distance transform. *International Journal of Bio-Medical Computing*, 38, 131-140.
- Niyazi, M., Niyazi, I., Belka, C., 2007: Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. *Radiation Oncology*, 2, 4.
- Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., Huber, W., 2010: EBImage - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26(7), 979-981.
- Putman, M., Burton, R., Nahm, M.H., 2005: Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit. *Journal of Immunological Methods*, 302, 99-102.
- Severini, A.D., Borrs, L., Cirilo, A.G., 2011: Counting maize kernels through digital image analysis. *Crop Science*, 51, 2796.
- Sieuwert, S., De Bok, F.A., Mols, E., De Vos, W.M., Van Hylckama Vlieg, J.E., 2008: A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 275-278.
- Slusarewicz, P., Pagano, S., Mills, C., Popa, G., Chow, K.M., Mendenhall, M., Rodgers, D.W., Nielsen, M.K. 2016: Automated parasite faecal egg counting using fluorescence labelling, smartphone image capture and computational image analysis. *International Journal for Parasitology*, 46(8), 485-493.
- Szigeti G., 1997: Az állategészségügyi jelentőségű gombák. Az állatorvosi mikológia alapjai. Budapest, Europharma, 52-53.
- Tuboly S., Medveczky I., Rusvai M., Varga J., 1999: Állatorvosi járványtan I. Állatorvosi mikrobiológia, bakteriológia, virológia, immunológia. Budapest, Mezőgazda kiadó, 521.
- Varga J., Rusvai M., Fodor L., 2018: A háziállatok fertőző betegségei. Budapest, MÁOK Kft., 624.

Vokes, M.S., Carpenter, A.E., 2008: Using CellProfiler for automatic identification and measurement of biological objects in images. *Current protocols in molecular biology* edited by Ausubel, F.M. et al., Chapter 14: Unit 14.17.

Yati, A., Dey, S., 2011: FlyCounter: a simple software for counting large populations of small clumped objects in the laboratory. *BioTechniques*, 51, 347-348.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Makrai László, egyetemi docensnek és Dr. Solymosi Norbert, egyetemi docensnek, akiktől rengeteg segítséget kaptam az egész munkám során.

Továbbá szeretném megköszönni az intézet minden munkatársának felém tanúsított türelmüket, és a sok hasznos és gyakorlatias tanácsot, amivel a laboratóriumi munkám során elláttak.

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: CZEISZING PÉTER MIKLÓS

Elérhetőség (e-mail cím): ceiszing.peter@gmail.com

A feltöltendő mű címe: KÜLÖNBÖZŐ BAKTERIUM ÉS GÖRZA LEVESTENYÉSZETEK ELŐCSÍRÁZÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ DIGITÁLIS KEPELKOTÓ ELIÁRÁS KIFEJLESZÉSE ÉS TESZTELÉSE

A mű megjelenési adatai: 2020

Az átadott fájlok száma: 1 FÁJL

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év11.....hó13....nap

Czeisny Péter Miklós

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyont elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyont koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*