

## Escherichia Coli Bakterisinin Antibiyotik Duyarlılığının Görüntü İşleme Teknikleriyle Belirlenmesi

Uğur Fidan<sup>1</sup>, Nurgül Özmen Süzme<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Afyonkarahisar.

e-posta: ufidan@aku.edu.tr, nozmen@aku.edu.tr

Geliş Tarihi:07.03.2016; Kabul Tarihi:31.03.2016

### Özet

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Bu çalışmanın amacı görüntü işleme teknikleri ile farklı antibiyotik gruplarının Disk Difüzyon Test'i sırasında bakterilere karşı gösterdiği davranışı zamana göre incelemektir. Bu sayede hem nicel veriler elde edilmiş hem de kontaminasyon problemlerinin önüne geçilmiş olacaktır. Bu çalışma ile antibiyotikler ve bakteri gruplarının etkileşimi belirlenerek mikrobiyolojik çalışmalar için alternatif değerlendirme metodunun geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu çalışmada Escherichia Coli (E. coli) suşlarının 24 saat inkübasyonu boyunca görüntüleri alınmış ve kaydedilmiştir. E. coli suşlarının üremelerinin gözlemlenmesi 20. saat ve sonrasında gerçekleşmiştir. E. Coli bakterisi Cl antibiyotiğine karşı dirençli, Zox ve C antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek duyarlılık seviyesi C antibiyotiği için belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre zaman aralığı (20-24 saat) boyunca ölçüm çaplarında büyük bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu yüzden Disk difüzyon metodunun uygulandığı çalışmalarda 24 saat inkübasyon beklenmeksizin bakterinin üreme hızına bağlı olarak duyarlılık-dirençlilik durumları belirlenebilir. Bu sonuç DDT yöntemi için daha kısa sürede test sonuçlarına ulaşabileceğini göstermiştir.

### Anahtar kelimeler

Görüntü İşleme; Disk Difüzyon Metodu; Antibiyotik Duyarlılık Testi; İnhibisyon Bölgesi Çapı

## Determination of Antibiotic Susceptibility of Escherichia Coli Bacteria with Image Processing Techniques

### Abstract

Antimicrobial susceptibility testing is performed to determine the in vitro activity of antimicrobial agents against a certain type of bacteria. The aim of this study, is to examine the behavior demonstrated against bacteria with different groups of antibiotics by disk diffusion test over time using image processing techniques. Whereby both quantitative data will be obtained and preventing the contamination problem. In this study determined the interaction of antibiotics and bacterial group and aims to develop alternative assessment methods for microbiological studies. In this study, 24 hours incubation for Escherichia coli (E. coli) strains taken image and recorded. Observation of growth of E. coli strains occurring on or after the 20th hour. E. Coli bacteria has been found resistant to antibiotics of the Cl and sensitive to Zox and C antibiotics. The highest level of sensitivity was observed for the C antibiotics. According to the results, in this time period (20-24 hours) it did not exhibit a large change in the diameter measurement. Therefore, the disk diffusion method is applied in the study 24 hours, depending on the bacteria's growth rate, without waiting until the incubation sensitivity-resistance state can be determined. This results have shown that in less time for DDT method access to test results.

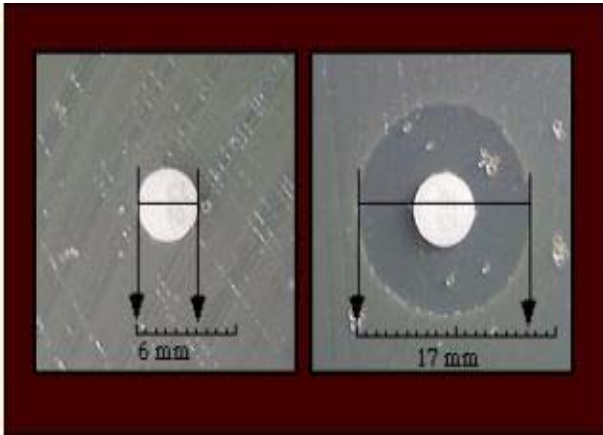
### Keywords

Image Processing; Disk Diffusion Method; Antimicrobial Susceptibility Testing; Diameter of Inhibition Zone

## 1. Giriş

Enfeksiyon sırasında canlıdan alınan örneklerden üretilen bakterinin, hangi ilaçlara ve bunların hangi yoğunluklarına duyarlı olduğunu saptamak amacıyla yapılan in-vitro (Laboratuvar ortamı yada yapay koşullarda) testlere Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) denir. ADT; Disk Difüzyon, Dilüsyon, E-Test, Otomatize Yöntemler ve Moleküler Yöntemler olmak üzere beş farklı test grubundan oluşmaktadır (Int Kyn. 1). Disk difüzyon yöntemi (DDT) antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde basitliği, tekrarlanabilirliği ve düşük maliyetli olması açısından mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilmektedir.

DDT yönteminde belirli yoğunluktaki bakteri, besi yerine yayılır ve antibiyotik emdirilmiş diskler bunun üzerine yerleştirilir. Disk difüzyon yönteminde disk çevresinde inhibisyon (bakterilerin üremediği dairesel bölge) alanı oluşur. Diskin etrafında oluşan inhibisyon alanlarının ölçülmesi ile mikroorganizmanın duyarlılığı hakkında yargıya varılır (Int Kyn. 2). Şekil 1'de görülen zon çaplarının ölçülmesi, kumpas ya da cetvel kullanılarak yapılmaktadır. Bu da ölçüm yapan kişi için kontaminasyon risklerine sebep olmakla birlikte kullanıcı kaynaklı hatalara neden olmaktadır.



Şekil 1. Zon çaplarının ölçümü

Klinik laboratuvar uygulamalarında otomasyon sistemleri son yıllarda gelişme göstermiştir. Bunun sebebi otomasyon sistemlerinin test maliyetlerini düşürmesi ve testlerin verimliliğini arttırmasıdır (Orsulak, 2000).

Yoon ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada agar pleytleri üzerinden alınan hiperspektral görüntülerde gıda kaynaklı patojenler üzerine çalışmıştır. Bu çalışmada k en yakın komşuluk algoritması ile doğruluk oranı % 92 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak renkli hiperspektral görüntülemenin gerçek hiperspektral görüntüleme karşısında kabul edilebilir doğrulukta gerçekleştirilebileceğini göstermişlerdir.

Le Page ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada 25 adet iyi karakterize edilmiş gram negatif bakteri serisi için gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlüklü kamera içeren özel inkubator AdvencisBio-System'i kullanarak disk difüzyon metodu ile oluşan zonların çaplarını ölçmüştür. Gram negatif bakterinin imipeneme olan duyarlılığının 3,5 saat içerisinde belirlenebildiğini, karbapenemazın üreten gram negatif bakterilerin ise 3 saat gibi kısa bir sürede duyarlılıklarının belirlenebildiğini ortaya koymuşlardır.

Huang ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmada azınlık popülasyondaki antibiyotiğe duyarlı bakterilerin algılanmasında, tek hücre algılanmasında kullanılan çok hassas bir yöntem olan akış sitometrik yöntemini antibiyotiğe karşı dirençli bakterilerin azınlık nüfusunu kanıtlamak için kullanmışlardır.

Gammoudi ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmada zamana bağlı olarak Escherichia coli bakterisinin morfolojik ve nano yapılı yüzey değişiklikleri incelemişlerdir. Bu çalışmada çubuk şeklindeki sağlıklı bir bakterinin ölümüne kadar süreçte yüzey değişimleri atomik güç mikroskobu ile incelenmiştir.

Ferrari ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada kolonileri saymak için konvolüsyonel sinir ağları (CNN) içeren bir çözüm önerisi sunmuşlardır. Bu çalışma sonucunda zorlu veri kümeleri için %92.8 doğrulukla sayımlar yapılmıştır. Koloni agregalarının önem düzeyinde tahmin edilebilmesi CNN

yöntemini geleneksel görüntü işleme yöntemlerine göre öne çıkardığını belirtmişlerdir.

Glasson ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada 2163 adet idrar kültüründen alınmış olan örneği mikrobiyoloji uzmanları tarafından değerlendirilmiş ve otomatik plaka okuma sistemi APAS® (LBT Innovations, Ltd, South Australia) ile karşılaştırmışlardır. APAS®'ın koloni bulmada %99,1 doğruluk oranına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmanın amacı gerçek zamanlı görüntü işleme teknikleri ile farklı antibiyotik gruplarının DDT sırasında bakterilere karşı gösterdiği davranışı zamana göre incelemektir. Bu sayede hem nicel veriler elde edilmiş hem de kontaminasyon problemlerinin önüne geçilmiş olacaktır. Bu çalışma ile antibiyotikler ve bakteri gruplarının etkileşimi belirlenerek mikrobiyolojik çalışmalar için alternatif değerlendirme metodunun geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## 2. Materyal ve Metot

Escherichia coli (ATCC 25922) bağırsak bakterisi olarak memeli ve kuşlarda bulunmaktadır. Bağırsak faaliyetlerinde flora ile dengeli biçimde bulunmaktadır. Bağışıklığın düşmesiyle doku ya da kana karışarak enfeksiyon özelliği taşımakta ve ishale neden olmaktadır (Int Kyn. 3). Bu çalışmada kullanılan Escherichia coli bakterisi Afyon Halk Sağlığı Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Stoklardan alınan mikroorganizmalar Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 10<sup>-2</sup> dilüsyonu yapılan aktif kültürden steril swaplar ile önceden hazırlanan MHA (Merck 1.05437) CE besiyeri üzerine sürümleri yapılmıştır. Her petri kutusuna 3 farklı antibiyotik disk yerleştirilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir.

Görüntülerin alınması ve inkübasyonun yapılması için tasarlanan kabin Şekil 2' de görülmektedir.



Şekil 2. Tasarlanan inkübasyon kabini

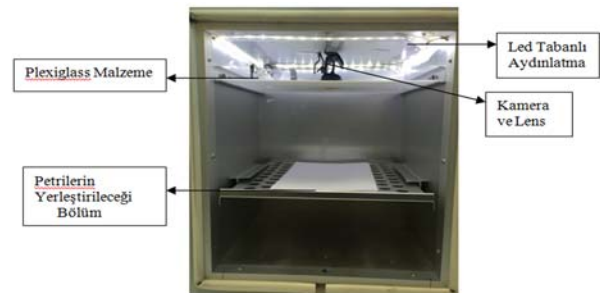
Müller Hinton Agar kullanımında 34 g Müller Hinton Agar 100ml su ile çözülmektedir (Int Kyn. 4). 85 g Müller Hinton tartım yapılarak 250 ml distile su ile çözülmüştür. Antibiyotik disk olarak Şekil 3' te gösterilen Bioanalyse firması tarafından üretilen 30 mcg'lık Cefprozime (Zox), Cephalexin (C) ve Chloramphenicol (Cl) kullanılmıştır.



Şekil 3. Antibiyotik disk

### 2.1. Disk Difüzyon Testi ile Eşzamanlı görüntülerin Alınması ve Analizi

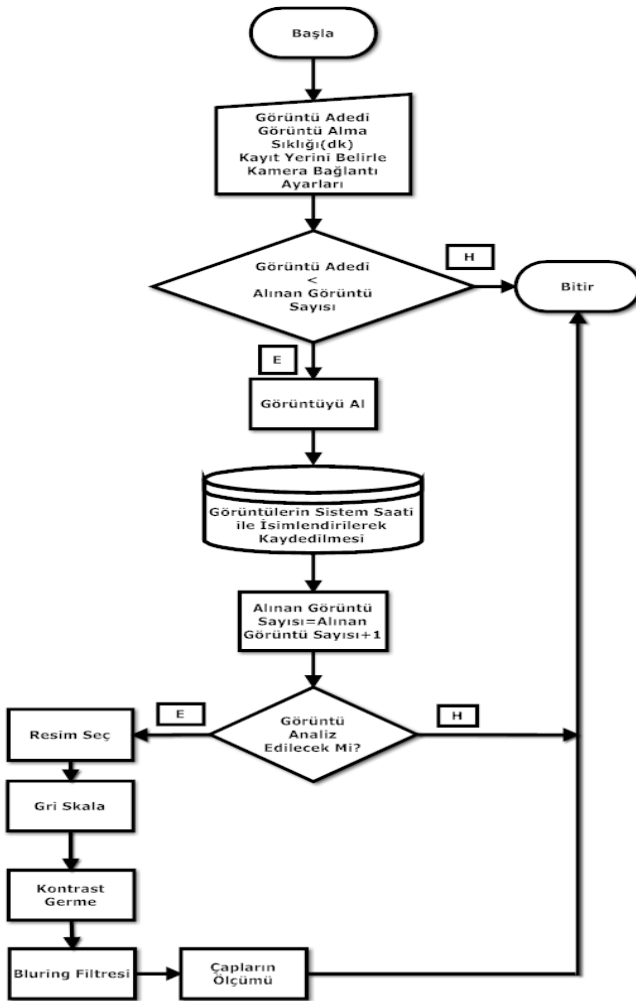
Oransal İntegral Türev (PID, A Proportional Integral Derivative) kontrollü Elektromag M3025p model etüv küf, maya ve bakteri gelişimi için gerekli ortam şartlarının sağlanması için revize edilerek çalışmaya uygun hale getirilen kabin Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. İnkübatör kabini iç tasarımı

Görüntülerin alınabilmesi için 1280x720 çözünürlüklü Microsoft 720p HD USB kamera kabin içerisine yerleştirilmiştir. Görüntü işleme teknikleri ile kameradan alınan görüntülerin işlenebilmesi için kabin içerisine aydınlatma sisteminin montajı yapılmıştır. Görüntü işlemenin önemli ön aşamalarından olan aydınlatmanın homojenliği test edilerek inkübasyon kabini kullanıma hazır hale getirilmiştir. Petri kaplarının yerleştirilmesi için gerekli olan taşıma platformu kabin ısı dağılımını etkilememesi ve görüntü odağını sağlayacak şekilde kabin zemininden 10 cm yukarıda konumlandırılmıştır.

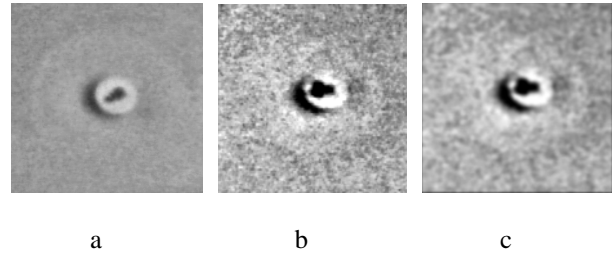
Şekil 5'te görüntülerin kaydedilmesi ve analizi için geliştirilmiş olan bilgisayar yazılımına ait akış şeması görülmektedir. Görüntülerin alınması ve kaydedilmesi program aracılığı ile yapılmaktadır.



Şekil 5. Programa ait algoritma

Görüntüler isteğe bağlı olarak anlık alınabilirken belli bir zaman aralığı içerisinde alım sıklığı belirlenerek kayıtlar yapılabilir. Analiz işleminde, kullanıcı ilk olarak analiz etmek istediği görüntü sayısını girmektedir. Ardından analiz edeceği görüntüleri seçmektedir. Kullanıcının yaptığı seçime göre görüntülerde kaç tane alan için alan belirlemesi yapmak isteniyorsa sayısını girebilmektedir.

Çap ölçümlerinin kalibrasyonu için antibiyotik diskler kullanılmıştır. Antibiyotik disklerin çapı 6 mm olup çapın belirlenmesinde 55 piksel sayısının 6 mm'ye karşılık geldiği belirlenmiştir. Oluşan inhibisyon zone çapları piksel cinsinden belirlenmiş ve oran orantı ilişkisi kullanılarak mesafe bilgisine dönüştürülmüştür. Analiz aşamasında görüntüler gri skalaya çevrildikten sonra görüntü ön işleme adımları olan kontrast germe ve filtreleme işlemlerine tabi tutulmuştur. Şekil 6'da C antibiyotigi için uygulanan metodlara ilişkin görüntü adımları verilmiştir. Farklı filtreleme metotları denenmiş ve bu görüntü için en iyi sonucu blurring filtresi vermiştir. Gerçekleştirilen yazılım 4gb ram 2 çekirdek işlemcisi olan Hp Compac 6730p model dizüstü bilgisayarda çalıştırılmıştır.



Şekil 6. a) Gri seviye görüntüsü b) Kontrast germe c) Blurring filtresi uygulanmış görüntü

### 3. Bulgular

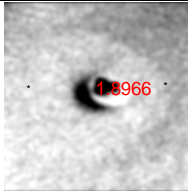
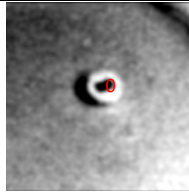

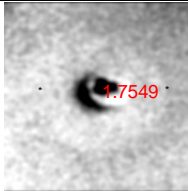
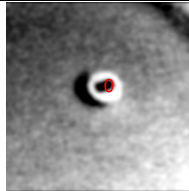

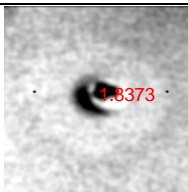
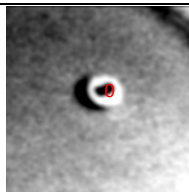

Şekil 7'de gösterildiği biçimde, ekimi yapıp antibiyotik disklerin yerleştirilmesi sonrasında petri kapları 37°C'ye ayarlanmış olan kabin içerisine yerleştirilmiş ve görüntünün istenen aralıklarla alımı ve kaydedilmesi sağlanmıştır.



Şekil 7. Görüntü Kaydının Alınması

Geliştirilen yazılım ile görüntü adedi 24 ve görüntüleme sıklığı 1 saat olacak şekilde ayarlanmış ve görüntüler alınmıştır. DDT analizinde petri kabına yerleştirilen antibiyotik diskin ve oluşan inhibisyon bölgesinin netliğini arttırmak için görüntüler bölgelere ayrılmış ve görüntü analizi üzerinden inhibisyon çapları ölçülerek Tablo 1' de verilmiştir .

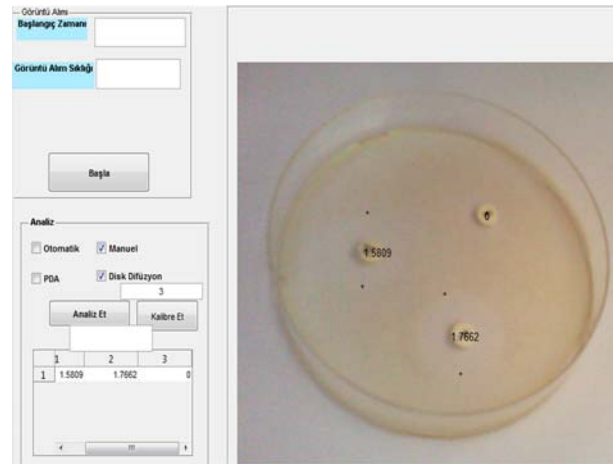
Tablo 1. Zone Alanlarının Süreye (Sr) Bağlı Belirlenmesi ve Ölçülmesi

Sr	zox	cl	C
20	 Piksel:161	 Piksel:0	 Piksel:202
22	 Piksel:149	 Piksel:0	 Piksel:187
24	 Piksel:139	 Piksel:0	 Piksel:175

Yirminci saatten itibaren antibiyotik disklerin bakterideki üremeden dolayı bakteri üzerindeki etkinliği gösterebildiğinden 20 ila 24. saat

aralıklarında alınan görüntüler üzerinde inhibisyon alanı belirlenmiştir. E.coli bakterisi Cl antibiyotiğine karşı zon oluşmadığı (0 cm) dirençli, Zox ve C antibiyotiklerine karşı duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek duyarlılık seviyesi 202 piksel (2.027 cm) zon alanına sahip C antibiyotiğinde tespit edilmiştir.

Alınan görüntülerin analizi için tasarlanan arayüz yardımıyla kişinin isteklerine bağlı olarak analiz işlemleri yapılmış ve ölçüm sonuçları veri tabanına kaydedildiği arayüze ait görüntü Şekil 8'de verilmektedir.



Şekil 8. DDT Görüntü Analizi

#### 4. Tartışma ve Sonuç

E. coli suşlarının 24 saat inkübasyonu boyunca görüntüler alınmış ve kaydedilmiştir. E. coli suşlarının üremelerinin gözlemlenmesi 20. saat ve sonrasında gerçekleşmiştir. Bu zaman aralığı (20-24 saat) boyunca ölçüm çaplarında büyük bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu yüzden Disk difüzyon metodunun uygulandığı çalışmalarda 24 saat inkübasyon beklenmeksizin bakterinin üreme hızına bağlı olarak duyarlılık-dirençlilik durumları belirlenebilir. Bu sonuç DDT yöntemi için daha kısa sürede test sonuçlarına ulaşabileceğini göstermiştir.

Bu çalışma sonucunda mevcut değerlendirme kriterlerine alternatif olarak disk difüzyon metodunun uygulanması esnasında inhibisyon zonlarının zaman içerisinde değişimleri görüntü işleme teknikleri ile belirlenerek mikrobiyolojik



çalışmalar için alternatif değerlendirme metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen metot sayesinde hem nicel veriler elde edilmiş hem de kontaminasyon problemlerinin önüne geçilmiştir. Yapılan sınırlı sayıdaki denemelerde gerçekleştirilen çalışma olumlu sonuçlar vermektir. Ancak yapılan çalışmanın farklı türdeki bakteriler ve antibiyotikler için tekrarlanarak doğruluğunun belirlenmesi çalışmanın devamında yapılacak çalışmalar arasındadır.

### **Teşekkür**

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gereken altyapı desteğinden dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz (13.MUH.09).

### **Kaynaklar**

Gammoudi, I., Mathelie-guinlet, M., Morote, F., Beven, L., Moynet, D., Grauby-heywang, C., and Cohen-bouhacina, T. (2016). Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **141**, 355-364.

Glasson, J., Hill, R., Summerford, M., and Giglio, S. (2015). Evaluation of an Image Analysis Device (APAS®) for Screening Urine Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-02365.

Ferrari, A., Lombardi, S., and Signoroni, A. (2015, August). Bacterial colony counting by Convolutional Neural Networks. In Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2015 37th Annual International Conference of the IEEE (pp. 7458-7461). IEEE.

Huang, T., Zheng, Y., Yan, Y., Yang, L., Yao, Y., Zheng, J., and Yan, X. (2016). Probing minority population of antibiotic-resistant bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, **80**, 323-330.

Le Page, S., Raoult, D., and Rolain, J. M. (2015). Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: A paradigm for evaluating resistance to imipenem and

identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *International journal of antimicrobial agents*, **45(1)**, 61-65.

Orsulak, P. J. (2000). Stand-alone automated solutions can enhance laboratory operations. *Clinical chemistry*, **46(5)**, 778-783.

Yoon, S. C., Shin, T. S., Lawrence, K. C., Heitschmidt, G. W., Park, B., and Gamble, G. R. (2015). Hyperspectral imaging using RGB color for foodborne pathogen detection. *Journal of Electronic Imaging*, **24(4)**, 043008-043008.

### **İnternet kaynakları**

1-<http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/1282011115036-41.pdf>, (10.01.2016)

2-<http://www.klimik.org.tr/wpcontent/uploads/2012/02/982011134654-klimik2011OzetKitabi.pdf>, (15.01.2016)

3-<https://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944105010.pdf> (15.01.2016)

4-[http://www.mikrobiyoloji.org/TR/pdf/merckmikrobiyoloji\\_elkitabı.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/TR/pdf/merckmikrobiyoloji_elkitabı.pdf), (24.03.2016)