



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. április

Áramlási citometria elven alapuló új sejtszámlálási módszer validálása

***Salmonella* tenyészetén**

Validation of a new cell counting method based on flow cytometry in *Salmonella* cultures

Bérczes Dóra Ildikó

TEIHN0

Biomérnök, képzési szint: alapképzés

nappali

Budai Campus

Témavezetők: Késmárki Erik, technológiai szakértő, Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.

Rezessyné Dr. Szabó Judit, egyetemi magántanár

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

Tartalom

1	Bevezetés.....	1
2	Célkitűzés	2
3	Irodalmi áttekintés.....	3
3.1	<i>Salmonella</i> nemzetség	3
3.1.1	Általános jellemzők	3
3.1.2	Szaporodási jellemzők és kimutatási módszerek.....	3
3.1.3	<i>Salmonella</i> nemzetségek által okozott megbetegedések.....	4
3.1.3.1	Állatok szalmonellózisa	4
3.1.3.2	Emberek szalmonellózisa, klinikai tünetek	6
3.1.4	Vakcinázás jelentősége a szalmonellózis kivédésére	7
3.2	Vakcináció.....	7
3.2.1	Vakcinák osztályozása.....	8
3.2.2	Az adjuvánsok szerepe	9
3.2.3	Vakcinák előállítási technológiája.....	10
3.2.3.1	Baktériumok elleni vakcinák előállítása.....	10
3.2.3.2	Vírusok elleni vakcinák előállítása	10
3.3	Sejtszámlálási módszerek	11
3.3.1	Hagyományos sejtszámlálási módszerek	11
3.3.2	Áramlási citometria elvén működő sejtszámlálási módszer.....	12
3.3.2.1	Működési elve.....	12
3.3.2.2	Felhasználási területe	16
4	Anyagok és módszerek.....	17
4.1	Vizsgált baktérium	17
4.2	Anyagok	17
4.3	Eszközök.....	17
4.4	Módszerek	17
4.4.1	Szélesztéses sejtszámbecslés.....	17
4.4.2	Élő sejtszám-meghatározás impedancia mérésen keresztül	18
4.4.3	Puffer oldatok optimális hőmérséklet értékének meghatározása.....	18
4.4.4	Statisztikai módszerek	19
4.4.4.1	Kétmintás t-próba.....	19
4.4.4.2	Lineáris regresszió	19
4.4.4.3	Varianciaanalízis.....	20
4.4.4.4	TOST ekvivalencia teszt (Two one-sided t-test).....	21
4.4.5	Vezetőképeség vizsgálata eltérő hőmérsékleti értékeken.....	21

4.4.6	Az impedancia mérésen alapuló élő sejtszám-meghatározási módszer analitikai teljesítményjellemzőinek vizsgálata	22
4.4.6.1	Robusztusság vizsgálat.....	22
4.4.6.2	A módszer precizitási paramétereinek vizsgálata	22
4.4.6.2.1	Operátorok közötti pontosság	22
4.4.6.2.2	Vizsgálaton belüli precizitás vizsgálata.....	23
4.4.6.2.3	Vizsgálatok közötti precizitás	23
4.4.6.3	Specifikusság vizsgálat	24
4.4.6.4	Linearitás vizsgálat	26
4.4.6.5	Pontosság vizsgálat	26
5	Eredmények és értékelésük.....	29
5.1	Vezetőképeség a hőmérséklet függvényében.....	29
5.2	A BactoBox baktérium sejtszámláló mérőműszer analitikai paramétereinek kiértékelése...30	
5.2.1	Robusztusság vizsgálat eredménye	30
5.2.2	Precizitási paraméterek.....	31
5.2.2.1	Operátorok közötti pontosság	31
5.2.2.2	vizsgálaton belüli precizitás.....	32
5.2.2.3	vizsgálatok közötti precizitás.....	33
5.2.3	Specifikusság	33
5.2.4	Linearitás vizsgálat.....	34
5.2.5	Pontosság.....	36
6	Összefoglalás	40
7	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	42
8	INTERNETES FORRÁSOK.....	43
9	MELLÉKLETEK.....	44

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)

WFI: injekciós víz (water for Injection)

CV: variancia-együttható (coefficient of variation)

BB: BactoBox

RSD: relatív szórás (relative standard deviation)

CFU: telepképző egység (colony forming unit)

ICC: ép sejtek száma (intact cell count)

TSA: tripton szója agar (tryptic soy agar)

ELISA: enzimhez kötött immunszorbiens próba (enzyme-linked immunosorbent assay)

1 BEVEZETÉS

A *Salmonella* világszerte veszélyforrást jelent emberre és állatra egyaránt. Az emberi fertőzések legtöbb esetben élelmiszer eredetűek. A fogyasztót károsító ágensek körülbelül 70%-a élelmiszerrel kerül be a szervezetbe, de közvetlen és közvetett állatokkal való érintkezés útján is fertőzést okoz. Ilyen tömeges megbetegedést okozó mikrobiológiai fertőzés a szalmonellózis is. Az élelmiszerek feldolgozásának és tartósításának célja, a termékek minőségi tulajdonságainak kialakítása mellett a mikroorganizmusok elleni védekezés. A vakcinázást csak az utóbbi években sorolták az állatok szalmonellózisa elleni védekezés gyakorlatban alkalmazható specifikus lehetőségei közé. Ennek oka, hogy a *Salmonella* virulencia faktorokról, azoknak a kórfejlődésben játszott szerepéről és a bél-immunitás kialakulásának részleteiről csak a későbbi tanulmányok során szereztek bővebb ismereteket (Ariel, 2007; Hoelzer *et al.*, 2011).

A vakcinák megfelelő minőségének szempontjából felmerült az igény gyorsabb és megbízhatóbb sejtszámlálási módszerek kidolgozására és bevezetésére. A hagyományos mikrobiológiai módszerek munka és időigényesek, valamint költségesek, ezért nem elégítik ki a fent említett igényt. Ezért a vizsgálati idő csökkentése érdekében műszeres mérési módszereket fejlesztettek (Erdősi, 2014; Szakmár, 2009). A hagyományos sejtszámlálási eszközök helyett egyre több innovatív sejtszámlálási módszer került validálásra, amelyek az ipari alkalmazás követelményeinek kielégítését célozzák. Kutatómunkám során az áramlási citometria elvén működő BactoBox mérőműszer műszaki jellemzőit kívántam feltérképezni, valamint a *Salmonella* tenyészet élő sejtszám-meghatározásra való alkalmazhatóságát bizonyítani, továbbá az alkalmazott mérési eljárást validálni.

2 CÉLKITŰZÉS

A sejtszámlálási módszereknél a lassú válaszdő több olyan iparágban problémát jelent, ahol a megfelelő minőség biztosítása érdekében elvárás a gyors eredmény szolgáltatás. Ezért indokolt a gyors sejtszámlálási módszerek fejlesztése. Munkám során mikroorganizmus-szuszpenziók élő sejtszámának meghatározására alkalmas BactoBox mérőműszert használtam, amely a hagyományos, mikrobiológia kvantifikációs módszerek helyett kínál alternatívát. Laboratóriumi körülmények, valamint ipari fermentációk során egyaránt alkalmas nagy sejtszámú tenyészetek mennyiségi meghatározására. Igazán hasznos eszköz a baktériumszám meghatározásához bakteriális vakcinák előállítása során. Mérési elve az adott sejt elektromos tulajdonságainak elemzésén alapul.

Kutatásaim célja *Salmonella* tenyészetek baktériumtiterének gyorsabb meghatározására alkalmas módszer kifejlesztése volt, majd az analitikai teljesítményjellemzők vizsgálatán keresztül a módszer validálása. A hagyományos szélesztéses sejtszámbecslés eredményeivel hasonlítottam össze a BactoBox által kapott eredményeket, így ellenőrizve az új eszköz pontosságát. A mérést befolyásoló tényezők vizsgálatát követően értékeltem a módszer pontosságát, linearitását, specifikusságát, precizitási paramétereit.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 SALMONELLA NEMZETSÉG

3.1.1 ÁLTALÁNOS JELLEMZŐK

A *Salmonella* az *Enterobacteriaceae* családba tartozik, 2-5 µm hosszú, pálcika alakú, kevés kivételtől (pl. *S. gallinarum*) eltekintve csillós, Gram negatív, heterotróf, fakultatív anaerob baktérium. Egyes *Salmonella*-szerotípusok felületén fimbriák is találhatók. A szalmonellákat a 16S rRNS-t kódoló gének szekvenciaanalízise alapján két fajba sorolják (*S. enterica* és *S. bongori*). Az egyes fajokon és alfajokon belül még megkülönböztetnek kb. 2400 szerotípust. Az egyes szerotípusok földrajzi elterjedtségében, patogenitásban és gazdapreferenciájában jelentős különbségek vannak. A gazdaspecifikus szerotípusok közé tartozik például a *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* és a *S. typhisuis*. A széles gazdaspektrummal rendelkező szerotípusokra minden emlős- és madárfaj fogékony, az azonban, hogy a betegség kialakul-e bennük, számos tényező (az állat faja, kora, ellenállóképessége, a *Salmonella* szerotípusa, virulenciája, a felvett mennyiség, a bejutás módja) függvénye (Hoelzer *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2018).

3.1.2 SZAPORODÁSI JELLEMZŐK ÉS KIMUTATÁSI MÓDSZEREK

Ellenállóképességük nem túl nagy: 70 °C-ra hevítve 1-2 percen belül elpusztulnak, ugyancsak percek belül elölhetők izopropil-alkohollal és más fertőtlenítőszerrel is. Hónapokig életben maradnak azonban a külvilágban, bélsárban, természetes vizekben, trágyázott talajokban, takarmányokban, illetve élelmiszerekben el is szaporodhatnak. Hónapokig túlélnek mélyhűtött élelmiszereken is. Aerobok, fakultatív anaerobok, közönséges és véresagaron egyaránt jól szaporodnak, telepeik 24 óra alatt kifejlődnek. Bélsárból és egyéb, erősen szennyezett anyagokból való kitenyésztésükhöz szelektív és differenciáló táptalajokat (brómtimolkék-laktóz-kristályibolya, fenolvörös-laktóz-brillantzöld, bizmutszulfit agar) használnak, szükség szerint előzetes dúsítás (más baktériumfajok szaporodását gátló tápfolyadékokban való tenyésztés) után. A szalmonellák kimutatására, illetve azonosítására dúsítók-ból, tenyészetekből, bélsárból egyre szélesebb körben alkalmaznak gyors mikrobiológiai ellenőrző módszereket, mint például:

- Polimeráz-lánreakció (PCR), amely a DNS enzimatisz amplifikálására használt molekuláris biológiai technológia. Lehetővé teszi a DNS kis darabjainak megsokszorozását analízis céljából. Általánosan használt módszer élettani kutatásokban vagy egészségügyi laboratóriumokban.
- A színreakción alapuló mérési módszer, ahol a prokarióta sejtek anyagcserejére jellemző hidrogén-transzport aktivitás redox indikátorokkal kimutatható.

- Az ATP biolumineszcencia mérés, amelynek lényege, hogy a vizsgált mintához luciferáz enzimet adnak, az enzim reakcióba lép az élő szervezetek (mikroorganizmusok, állati sejtek) energiatároló komponensével (az ATP-vel) és világítani kezd.
- Az impedimetriás módszerek, amelyeknek alapja, hogy miközben a mikroorganizmusok a tápközegben szaporodnak, metabolizmusuk során a töltés nélküli vagy gyenge töltéssel rendelkező szubsztrátumot kis molekulatömegű, nagy töltésű molekulákká (pl. aminosavak, tejsav) alakítják, megváltoztatva ezzel a tápközeg impedanciáját (váltóáramú ellenállását), illetve vezetőképességét.
- A redoxpotenciál-mérés, ahol a mikroorganizmusok szaporodását a tápközeg redoxpotenciál-változásának mérése alapján detektálják. A mért érték változásának kiértékelése lehetőséget teremt a vizsgált minták élő sejtszámának az impedimetriás módszereknél nagyobb tartományú meghatározására (Erdősi, 2014; Rohonczy, 2014).

A bakterológiai vizsgálat mellett a fertőzöttség felderítésére igénybe vehetők szerológiai próbák, pl. az agglutinációs próba, az immunoblot és különféle ELISA módszerek (Varga *et al.*, 2018).

3.1.3 SALMONELLA NEMZETSÉGEK ÁLTAL OKOZOTT MEGBETEGEDÉSEK

A szalmonellózis világszerte előfordul, állatokban és emberekben egyaránt igen gyakori megbetegedés. Az élelmiszer eredetű megbetegedések közé tartozik endémiás természete, magas morbiditása és az élelmiszerek széles köréhez köthető volta miatt (Erdősi, 2014). Klinikai tünetekben megnyilvánuló szalmonellózis leggyakrabban a sertésben és a baromfifajokban fordul elő, de bármely emlős- és madárfajban is gyakori. Gyakran hullókból is izolálhatók szalmonellák. Az állatokban lázas általános tünetekkel, vérmérgezéssel (septicaemia) és bélgyulladással járó betegség alakul ki, míg emberekbe jutva hasmenéssel járó gyomor- és bélnyálkahártya gyulladást (gastroenteritis) okoz. Az állatokban paratífuszt (enterális láz) okozó szalmonellák legtöbbször fertőzött, állati eredetű élelmiszerekkel jutnak az emberbe. A *S. enteritidis* által előidézett megbetegedések kontaminált tojás és tojástermékek, valamint baromfihús fogyasztásához köthetők, míg a *S. typhimurium* okozta megbetegedések szennyezett sertés-, marha- és baromfihús fogyasztása esetén fordulnak elő (Erdősi, 2014). *Salmonella*-fertőzést bármelyik fakultatív patogén szerotípus létrehozhat, például a *S. typhimurium*, *S. infantis*, és a *S. anatum* (Varga *et al.*, 2018).

3.1.3.1 ÁLLATOK SZALMONELLÓZISA

A *Salmonella* ssp. által okozott szalmonellózis az egyik leggyakoribb zoonózisos betegség, amely nyers élelmiszerekkel, állati termékekkel, köztük baromfihússal áterjedhet az emberre. A *Salmonella* természetes körülmények között számos vad-, illetve háziállat béltraktusában jelen van. A

mikroorganizmus a környezetből hús-, és zöldség ételek elfogyasztásával kerülhet be az emberi szervezetbe (Popoff, Bockemühl & Brenner, 2000). A *Salmonella typhimurium* kezdeti tünete közé a vizenyős sárga hasmenés tartozik, kezdetben vér vagy nyálka nélkül. A hasmenés egy sertésnél általában 3-7 napig is eltarthat. A székletben szórványosan vér jelenhet meg. Az érintett sertések lázasak, csökkent a takarmányfelvételük és dehidratáltak, ami összefüggésben van a hasmenés súlyosságával és időtartamával. A legtöbb sertés klinikailag teljesen felépül, de egy részük akár 5 hónapon keresztül is hordozó maradhat. Alkalmanként végbélszűkület is kialakulhat, a belek összetapadhatnak, a tüdő elváltozhat, tömött, szürke lesz. A *S. typhimurium*-ban szenvedő sertéseknél vékony- és vastagbélgyulladás (enterocolitis), az újszülött sertéseknél bélelhalás (necrotizing enterocolitis) veszélye léphet fel. Az érintett szegmenseknél jellemzően megvastagodás tapasztalható, a nyálkahártya vörös és érdes megjelenésű. Eróziók és fekélyek is kialakulhatnak, amelyek szürkés, nyúlós, tapadós váladékkal borítottak (1.ábra) (Griffith *et al.*, 2019).



1. ábra: Megvastagodott nyálkahártya tapadós, sárgás-barna váladékkal
(Griffith *et al.*, 2019)

Klinikailag a szarvasmarhák *Salmonella* fertőzése jellemzően vizes vagy véres hasmenés formájában nyilvánul meg, és gyakran társul lázzal, depresszióval, anorexiával, kiszáradással és endotoxémiával (mely az endotoxinok felhalmozódását jelenti a vérben és a test szöveteiben). A kevésbé gyakori klinikai megnyilvánulások közé tartozik az abortusz és a légúti betegségek. Különösen a felnőtt állatoknál a *Salmonella* gyakran okoz szubklinikai betegségeket, és hónapokig vagy évekig fennmarad a fertőzött farmokon. A leggyakrabban előforduló szerotípusok szarvasmarháknál a *S. typhimurium*, *S. dublin* (Hoelzer *et al.*, 2011).

A madarak körében klinikai tünetek közé tartozik az anorexia, a hasmenés, a kiszáradás, a kikelés csökkenése. A *Salmonella enteritidis*, valamint a *typhimurium*, *kentucky* és *heidelberg* szerotípusok

gyakran kimutathatók klinikailag egészséges, valamint beteg csirkék és pulykák között, ami potenciálisan fontos kockázatot jelent az emberi egészségre nézve (Hoelzer *et al.*, 2011).

Az akut enterális szalmonellózis gyakori a felnőtt juhoknál. Tünetei a láz, étvágytalanság, depresszió és hasmenés, míg a fiatal állatokban vérmérgezés figyelhető meg. Egyes szerotípusok, mint például a *typhimurium* vagy a *dublin* fertőzés abortuszt okoz. A gasztrointesztinális betegség vagy a vérmérgezés klinikai tüneteit mutató állatok jelenthetik a legnagyobb kockázatot az emberre, de a klinikailag egészséges állatok is jelentős veszélyt jelenthetnek (Hoelzer *et al.*, 2011).

Összefoglalva, a fertőzött állatok nagyon sokféle klinikai tünetet mutathatnak, és valós kockázatot jelent az emberre való átvitel lehetősége. Kockázati tényezői egyértelműen különböznek állatfajonként, korcsoportonként és földrajzi régióként (Hoelzer *et al.*, 2011).

3.1.3.2 EMBEREK SZALMONELLÓZISA, KLINIKAI TÜNETEK

A *Salmonella* megbetegedések kiemelkedő jelentőséggel bírnak: számos országos szintű járványügyi nyilvántartási rendszerben, mint a bakteriális eredetű, élelmiszer okozta megbetegedések fő kórokozója. Klinikai megjelenése szerint tífuszos (typhoid) és nem tífuszos (nontyphoid) szalmonellózist képes okozni. A tífuszos szalmonellózist a *S. typhimurium* és a *S. paratyphi* okozhatja, amelyek csak az embert képesek megbetegíteni. A betegség az egész szervezetet megtámadhatja, így minden szervet érinthet és a test bármely pontján kifejtheti a hatását, így olyan krónikus betegséggé is válhat akár, mint például a reaktív arthritis (izületi gyulladásos megbetegedés), csontvelőgyulladás, szívizomgyulladás vagy idegrendszeri rendellenesség. Az enterális láz (hastífusz) a *Salmonella typhimurium* által okozott egész testet érintő súlyos betegség, ahol a tünetek a fertőzést követően 8-28 nap után jelentkeznek. A betegség jellemzően hasi görcsökkel, fokozatosan emelkedő lázzal jár, a bőrön vöröses elváltozások alakulhatnak ki. Annak ellenére, hogy a bélhurut tünetei a következő hetekben fokozatosan megszűnnek, a beteg az ampicillin, klóramfenikol vagy az együttesen alkalmazandó trimetoprim és szulfametoxazol hagyományos antibiotikumos kezelés befejezése után heteken belül visszaeshet. Súlyos szövődményei lehetnek például vérzés a bélben, hepatitis és pancreatitis (hasnyálmirigy-gyulladás) (D'aoust, 1994; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011).

A nem tífuszos (zoonózis) szalmonellózist az emberben a *Salmonella typhimurium* és a *S. paratyphi* kivételével szinte mindegyik szerotípus okozhat. Tünetei közé tartozik a vizenyős hasmenés, hasi- és izomfájdalom, illetve a láz, amelyek a fertőzést követően 8-72 órán belül jelentkeznek. Az invazív kórokozó a nyirok- és érrendszeren keresztül a bélrendszerből más szervekhez is eljuthat, így húgyuti fertőzéseket, tályogokat, tüdőgyulladást és légzőrendszeri betegségeket idézhet elő. A betegek még egy évig is akár hordozók lehetnek (D'aoust, 1994; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

3.1.4 VAKCINÁZÁS JELENTŐSÉGE A SZALMONELLÓZIS KIVÉDÉSÉRE

A szalmonellózis mind az emberek mind az állatok fertőző betegsége. A *Salmonella* nemzetség fajai gyakorlatilag minden gerinces szervezetből izolálhatók. Széles körben elterjedtek a környezetben, és általában megtalálhatók a szennyvizekben és minden olyan anyagban, amely fekáliával szennyezett. A *Salmonella* hasmenést és szisztémás fertőzéseket okoz az emberben. A fertőzés leggyakrabban az állatokból származó élelmiszerek fogyasztása miatt következik be. Több mint 2400 *Salmonella* szerotípus közül legtöbb a gazdaszervezetek többségét képes megfertőzni, számos szerotípus egy gazdaszervezethez például a *S. typhimurium* (egér), *S. dublin* (szarvasmarhafélék), *S. gallinarum* (baromfi) és az *S. choleraesuis* (sertés) alkalmazkodott. A sertések a *Salmonella* szerotípusok széles skálájával fertőződhetnek meg, amelyek potenciálisan megfertőzhetik a sertéshúsból készült termékeket, így veszélyt jelenthetnek az emberi egészségre (Griffith *et al.*, 2019). A szalmonellózisnak vannak társadalmi és gazdasági következményei is, amelyek komoly tudományos és közegészségügyi erőfeszítéseket igényelnek a helyzet javítása érdekében. Például a borjak szalmonellózis betegségének megelőzése érdekében élő attenuált vagy elölt *S. typhimurium*, *S. dublin*, esetenként egyéb szerotípust tartalmazó vakcinákat is igénybe vesznek. Életük első napjaiban, heteiben szájon át, aerogén vagy parentálisan, 1-2 hét időközönként, legalább kétszer egymás után végzett vakcinázást követően a megbetegedett és a baktériumhordozó borjak számának jelentős csökkenését észlelték (Varga *et al.*, 2018).

3.2 VAKCINÁCIÓ

A vakcinázás fő célja az immunológiai memória kialakítása, amely még a betegség kialakulása előtt lehetővé teszi a kórokozók gyors elpusztítását (Tóth *et al.*, 2016). Az elmúlt időszakban újabbnál újabb, az emberre és az állatra veszélyes fertőző betegségek váltak ismertté és a korábbi betegségek módosult formában jelentek meg, ami szükségessé tette a fertőző betegségek specifikus megelőzését, illetve a hatékony vakcinák előállítását. Egyre biztonságosabb oltóanyagok készítése vált lehetővé a baktériumok és a vírusok antigén-szerkezetének megismerésével. A vakcinák az állattenyésztés intenzívebbé tételét, a társállatok egészségének javítását, a pusztító állatbetegségek visszaszorítását pl. a sertéspestis, veszettség és a fertőzések gazdasági kártételeinek csökkentését is elősegítették. A vakcinákat rutinszerűen használják az állatgyógyászatban az állatok egészségének javítására (pl. macska immunhiányos vírusa, csomós bőrbetegség, sertések szaporodási és légúti szindróma elleni vakcinák), valamint az állatorvosi közegészségügyben (pl. veszettség, tuberkulózis és lépfene). A vakcinák előnye, hogy a megcélzott kórokozók ellen specifikus immunválaszt alakítanak ki. A vakcinaelőállítás legfontosabb eleme a vakcina immunogenitást hordozó hatóanyagának kiválasztása, amelyhez

nélkülözhetetlen az antigén topográfiájának, valamint variabilitásának ismerete (Arega *et al.*, 2022; Varga *et al.*, 2018). Például egy kis molekula (epitóp, peptid, toxin) immunogenitása nem elég nagy ahhoz, hogy ellenanyag termelést idézzon elő a szervezetben, de ha egy makromolekuláris hordozóhoz kapcsolva juttatják a szervezetbe, akkor megfelelő intenzitású immunválasz idézhető elő. Az immunogenitást, vagyis az antigén immunválaszt kiváltó képességét befolyásoló tényező lehet az antigén mennyisége, a szervezetbe történő bejutás helye és módja, illetve fontos tényező lehet az is, hogy hányadik alkalommal találkozott a szervezet az adott antigénnel.

3.2.1 VAKCINÁK OSZTÁLYOZÁSA

A vakcinák osztályozása történhet a vakcina hatóanyagának fajtája szerint (baktérium vagy vírus), annak típusa szerint (élő vagy elölt), illetve az antigén előállításának módja szerint is (hagyományos vagy újgenerációs).

- **A hagyományos állatgyógyászati vakcinák** főként élő, legyengített kórokozókból, teljesen inaktivált organizmusokból vagy inaktivált bakteriális toxinokból állnak és a kórokozó egészét tartalmazzák. Mivel a kórokozó összes epitópját tartalmazzák, ezért erős immunválaszt váltanak ki. Két csoport különíthető el:

1. Élő, legyengített teljes kórokozó: Ezek a vakcinák a leghatékonyabb védőoltások közé tartoznak, amelyek a kórokozó élő, szaporodóképes, de laboratóriumban legyengített, azaz betegséget nem okozó változatát tartalmazzák. Ilyen típusú vakcinákat viszonylag egyszerűen létre lehet hozni bizonyos vírusokból, viszont nehezebb előállítani az összetettebb kórokozók, például baktériumok és paraziták esetében. Ezek az oltás után enyhe, általában tünetmentes fertőzést okoznak és élethosszig tartó immunitást eredményezhetnek. Előnyük még, hogy nemcsak humorális, hanem celluláris és lokális immunválaszt is indukálnak, így intracelluláris/sejten belüli kórokozók (*Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*) ellen is rendkívül hatékonyak. Hátrányuk viszont, hogy használatuk során fennáll a más kórokozókkal való kontaminálódás, a perzisztálás, a rekombinálódás, valamint a revertálódás veszélye (Tóth *et al.*, 2016). Például mumpsz, kanyaró és a gyermekbénulás elleni védőoltások.
2. Elölt, inaktivált teljes kórokozó: Az elölt, szaporodásra képtelen inaktivált vakcinák biztonságosabbak, de kevésbé hatékonyak, illetve elősegíthetik az allergiás reakciókat, illetve autoimmun folyamatok kialakulását. Ide tartozik a petussis, influenza és a szamárköhögés elleni védőoltás.

- **Második generációs vakcinák:** alegység vakcinákat ide sorolják, amelyek a kórokozónak csak egyes jellegzetes immunreakciót kiváltó felületi fehérjéjét, egy epitópját tartalmazzák pl. Hepatitis B. A vírusszerű részecske vakcina hasonlóan fehérjealegység vakcina, aminél mesterségesen állítanak elő vírushoz hasonló, nem fertőzőképes részecskét (Tóth *et al.*, 2016; Tombácz, 2015).
- **A harmadik generációs vakcinák** esetében csak a fehérje előállításához szükséges kódoló RNS vagy DNS kerül bejuttatásra. Az egyik megközelítés a DNS vakcinák, amivel csak az antigént kódoló genetikai anyagot viszik be a szervezetbe. Mivel a nukleinsavak stabilabb vegyületek, mint a fehérjék, ezáltal a vakcina is stabilabbnak bizonyul. A DNS mellett az mRNS (messenger RNS) is alkalmazható vakcinaként. Hátrányuk az mRNS vakcináknak, hogy nem-specifikus, gyulladásos folyamatok indulnak el, ezt a mellékhatást úgy küszöbölték ki, hogy az uridin helyett módosított bázisokat (pl. pszeudo-uridin) építettek be az RNS láncba, ezzel lehetővé téve az mRNS humán alkalmazását. Biztonságosnak bizonyulnak, mivel az expresszió folyamata során természetes úton lebomlanak (Tóth *et al.*, 2016; Tombácz, 2015).

Tehát, ha a kórokozó csak egy alkotója van jelen oltóanyagként, akkor a reverzió, a betegség létrejötte nem áll fent veszélyként, de az egyetlen epitóp miatt a hatékonyság gyengébb (Nascimento & Leite, 2012; Tombácz, 2015; Tóth *et al.*, 2016).

Az immunitás növeléséhez a megfelelő epitópot, adjuvánst és a célba juttatás módját is megfelelően kell kiválasztani. A nem kívánt mellékhatásoknak a kiküszöböléséhez, vagyis, hogy biztonságos legyen az oltóanyag, biztosítani kell, hogy az alkalmazott adjuváns ne változtassa meg az oltóanyaggal elérni kívánt immunválaszt, ne idézzon elő autoimmunitást, ne legyen szennyezett, illetve, hogy ne épüljön be a genomba (Pállinger *et al.*, 2012).

3.2.2 AZ ADJUVÁNSOK SZEREPE

Az adjuválás általános definíciója: „bármely anyag vagy eljárás, amely a vakcina komponenseinek immunogenitását specifikusan növeli” (Edelman, 1980). Az adjuvánsok úgy erősítik fel a specifikus immunválaszt, hogy aktiválják a veleszületett immunrendszer azon jel átvivő útvonalait, amelyek hozzájárulnak a hatékonyabb adaptív immunválaszhoz. Jellegzetes mikrobiális struktúrákat felismerő, ún. mintázatfelismerő, receptorokon (PRR: pattern recognition receptor) keresztül fejtik ki immunstimuláló hatásukat (Tóth *et al.*, 2016). A rekombináns antigének számos esetben gyengébb immunogenitásúak egy teljes kórokozóhoz képest, gyorsabban kiürülnek a szervezetből, vagy nem megfelelően kerülnek bemutatásra az immunsejteknek, így vagy nem, vagy csak többszöri oltást követően váltanak ki hatékony immunreakciót, ezért széles körben alkalmaznak adjuvánsokat (Kálmán-Szekeeres, 2011). Az adjuvánsok a kezelés helyén gyulladásos állapotot hoznak létre, ettől tartósabb

immunválasz alakul ki. A vakcina-fejlesztők számára a fő kihívást a hatását hosszan kifejtő, lebomló, megfelelő immunválaszt kiváltó, olcsón előállítható, de mindenekelőtt minimális toxicitást vagy mellékhatást előidéző adjuváns előállítása jelenti. Eltérő hatású adjuvánsokat fejlesztettek ki, mint például szervesetlen sók: pl. alumíniumsók ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4); olaj-víz emulziók: pl. paraffin-olaj emulziók; szkvalén-alapú emulziók (MF59, AS03, AF03, Montanide); immunmodulátorok: citokinek (Tóth *et al.*, 2016).

3.2.3 VAKCINÁK ELŐÁLLÍTÁSI TECHNOLÓGIÁJA

A vakcinagyártás két nagy kihívása a kórokozók előállítása, illetve azok megbízható inaktíválása. Inaktíválásra kemikáliákat (pl.: formaldehid) vagy fiziko-kémiai kezeléseket (γ -sugár, β -sugár), esetleg molekuláris biológiai módszereket szokás alkalmazni (pl.: indukálható fág gének bevitelével lízist idéznek elő) (Németh, 2011).

3.2.3.1 BAKTÉRIUMOK ELLENI VAKCINÁK ELŐÁLLÍTÁSA

Hagyományos fermentációs technológiával szaporítják el a baktériumokat, azzal a különbséggel, hogy a patogén törzseket nagyobb odafigyeléssel állítják elő. Mindaddig, amíg élő kórokozó előfordulhat, a teljes szeparációt térben és időben fent kell tartani, mert megbetegedést okozhatnak. A feldolgozás során minden berendezést, szabályozó elemet úgy kell kialakítani, hogy a környezetbe ne kerüljön ki élő mikroorganizmus. Fontos minőségi követelmény az endotoxin mentesség. Az endotoxinok stabil anyagok, hősterilizés vagy vegyszeres kezelés hatására sem bomlanak el. A véráramba kerülő endotoxin miatt a szervezet védekező mechanizmusa túlterheltté válhat, szövetroncsolódáshoz, endotoxikus sokkhoz vezethet (Internet 3). Eltávolításukra feltétlen szükség van, amihez adszorpciós megkötést alkalmaznak. A baktérium sejttömeg inaktíválását vegyszeres kezeléssel (pl. formaldehid) végzik el (Pállinger, 2012).

3.2.3.2 VÍRUSOK ELLENI VAKCINÁK ELŐÁLLÍTÁSA

Élő attenuált, illetve inaktívált vírusokból is készítenek vakcinákat. A vírusok obligát paraziták, ezért pusztán táptalajon, a baktériumoknál alkalmazott fermentációs úton nem szaporíthatók, szükségük van egy gazdaszervezetre. A vírusok csak bizonyos fajok specifikus szöveteit fertőzik meg, tehát élő sejtekre van szükségük a működésükhöz. Laboratóriumi körülmények között megvalósítható a gerinces állatokban történő vírusszaporítás, de ez ipari léptékű technológiaként nem alkalmazható, ezért specializálatlan sejteket alkalmaznak a vírus szaporítására. Ilyen sejtek az embrióban találhatók. A leginkább elérhető a csirkeembrió, amely számos előnnyel jár, mivel kis egység, ezáltal a befertőződés esetén kisebb lesz a kár, emellett immunválasz sincs benne. Hátránya, hogy elég körülményes.

Nagyobb léptékben és rugalmasabban alkalmazható módszer a sejtenyészetekben történő vírustenyésztés. A kapott vírus szuszpenzió feldolgozása a szaporítás közegétől függetlenül hasonlóan történik. Az attenuált vírusok esetében tisztítás és formulázás következik, a patogén vírusok viszont inaktiválásra kerülnek. Ebben az esetben a vírusok nukleinsav állományát kell használhatatlanná tenni, úgy, hogy közben az epitópot alkotó fehérje molekulák ne károsodjanak. Leginkább szelektív kémiai reagenseket, alkilező szereket használnak (etilénimin, bis-etilénimin), amelyek a DNS-sel reagálnak. A reakció 2-24 órán keresztül tart, a végén feleslegben nátrium-tioszulfát oldatot adnak, ami lebontja az etilénimint. A kapott ártalmatlan vírus szuszpenzió koncentrációjának beállítása érdekében hígítást (vagy szükség esetén mikroszűrést) alkalmaznak, a megfelelő hatás elérésének biztosítására (Pállinger, 2012).

3.3 SEJTSZÁMLÁLÁSI MÓDSZEREK

Egy technológia során előállított sejtszuszenzió egyik legfontosabb követelménye az életképes sejtek koncentrációjának ismerete, ennek meghatározásához különféle sejtszámlálási módszereket alkalmaznak. A *S. typhimurium* esetén például a leggyakrabban alkalmazott rutinszerű kvantitatív kimutatási módszerei a tenyésztésen alapuló módszerek, az amplifikáció alapú próbák, pl. a valós idejű polimeráz láncreakció (real-time PCR) és az immunpróbák, például az enzimhez kötött próbák, a kemilumineszcens immunpróbák és a fluoreszcens immunpróbák. Ezeknek a módszereknek vannak bizonyos korlátai, például speciális műszereket és magasan képzett személyzetet igényelnek, valamint egyes módszerek időigényesek és hamis negatív eredményeket adhatnak. Ezért folyamatosan szükség van újabb és újabb, gyors és megbízható kvantifikálási módszerek kifejlesztésére (Ansari *et al*, 2017). Munkám során alkalmazott módszerek működési elvét tárgyalom részletesen a továbbiakban.

3.3.1 HAGYOMÁNYOS SEJTSZÁMLÁLÁSI MÓDSZEREK

A tenyésztéses csíraszámálási módszerek egy vizsgált közegben lehetővé teszik a szaporodni képes mikroorganizmusok számának meghatározását. A gyakorlatban legelterjedtebben alkalmazott vizsgálati módszerek: a telepszámlálós módszerek (lemezöntés, szélesztés). Általában a minta típusa és annak feltételezett csíraszama határozza meg, melyik módszert alkalmazzuk. A tenyésztésen alapuló csíraszám becslési eljárás azon a feltételezésen alapul, hogy minden sejtől telep fejlődik és minden telep 1 sejtől alakul ki. A kapott számértéket telepképző egység (CFU: colony forming unit) /minta tömeg (vagy térfogat) dimenzióban fejezzük ki. A legtöbb baktérium esetében az ép sejtek koncentrációja és a kolóniaképző egységek (CFU) között nagyfokú a korreláció, ezért a telepek száma és a hígítási tag ismeretében megbecsülhető az élő sejtek száma. A minták feldolgozásának ismétlésével,

illetve a párhuzamos lemezek számának növelésével a kapott értékek egyre jobban közelítik a valós értékeket. A hígítási-szélesztési és a lemezöntési csíraszám becslés célja a mikroorganizmusok csíraszám értékének meghatározása különféle tápágar lemezek felhasználásával. A módszer során a mikroorganizmusokat tartalmazó mintából általában 10-es léptékű (decimális) hígítási sorozatot készítenek. A hígítási sorozat megfelelő értékeiből ismert térfogatot tápágar lemezekre szélesztik, vagy a Petri-csészébe pipetázzák, adott térfogatú felolvasztott táptalajjal fedik és körkörös mozgattal egyenletesen eloszlatják benne a sejteket. A fertőzött lemezeket megfelelő hőmérsékletű termosztátba helyezik. Az inkubációs idő letelte után a kifejlődött baktériumtelepeket megszámlálják (csak azokat a táplemezeket értékelik, ahol jellemzően a telepszám 20 és 200 közötti), majd a kapott értéket a hígítás fokával megszorozzák, így a kiindulási minta mennyiségi egységének tenyésztendő baktérium mennyisége becsülhető (Borsodi *et al.*, 2018).

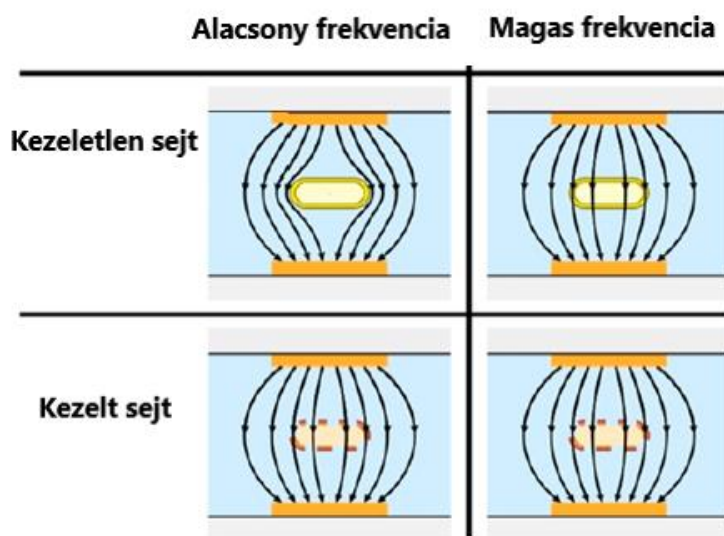
3.3.2 ÁRAMLÁSI CITOMETRIA ELVÉN MŰKÖDŐ SEJTSZÁMLÁLÁSI MÓDSZER

A BactoBox egy új, gyors alternatívát kínál a hagyományos sejtszámlálási módszerek helyett például bakteriális fermentációk monitorozására a folyamat közben vett minták elemzése által. Kedvezőbb a hagyományosan és széles körben alkalmazott növekedésen alapuló módszereknél, mert míg azok akár 1-3 napot is igénybe vehetnek mire eredményt adnak, a BactoBox-szal gyakorlatilag néhány perc alatt információt szerezhetünk a tenyészet élősejtszámáról. A módszer fontosságát támasztja alá, hogy a hosszú válaszidő és a nehezen tenyésztendő baktériumok komoly problémát és kockázatot jelentenek a különböző iparágakban.

3.3.2.1 MŰKÖDÉSI ELVE

Baktériumok sejtszámának meghatározására szolgáló eszköz, amely detektálási elvként elektromos impedanciát használ. Folyadékfázisban vékony kapillárisban átáramló sejteket elektromosvezetőképességük alapján egyenként megszámlálja, emiatt nevezik ezt a sejtszámlálásra alkalmazott technológiát impedancia áramlási citometriának (IFC) is. Az IFC egy innovatív technológia, amely a folyékony mintában lévő egyedi sejtek és részecskék jelölésmentes, gyors megszámlálására és jellemzésére alkalmas. A műszer a folyékony elektrolitban szuszpendált sejteket folyamatosan áramoltatja egy áramlási cellán keresztül, amelyben mikroelektrodák vannak elhelyezve. Az elektrodák érzékelik az impedancia változásait a sejt vagy részecske áthaladása során. A perturbáció közvetlenül összefügg a részecskék elektromos tulajdonságaival, ezért információt ad a szuszpenzió összetételéről, így alkalmas az életképes és az inaktivált sejtek megkülönböztetésére. Ha a határértéket meghaladó impedanciaváltozás észlelhető, azt a rendszer baktériumként számolja és elektromos tulajdonságai alapján megkülönbözteti a mintában lévő egyéb 0,5-5,0 µm anyagoktól/részecskéktől.

Egy állandó frekvencia értéken mérve az elektromos áram változását, lehetővé válik a baktériumok számának nyomon követése. Az impedancia válasz a frekvencia függvénye:



2.ábra: Impedancia válasz frekvencia függése (Berstelten, 2021)

A sejtek által kiváltott impedanciaváltozás eltér más, homogénebb részecskék (például kis üveg- vagy műanyag szemcsék) impedanciaváltozásától, mivel a sejtek szerkezete egy elektromosan szigetelő membránból és egy elektromosan vezető belső állományból áll – citoplazma belső vezetőképessége. Az impedanciát befolyásoló tulajdonságok közé tartoznak a méret, az alak, a membrán összetétele és a citoplazma vezetőképessége, ebből az következik, hogy a sejtek impedanciaválasza erősen frekvenciafüggő, és hogy a különböző frekvenciák a sejtek különböző tulajdonságainak vizsgálatára használhatók (Berstelten, 2021).

Alacsony frekvencia tartományban (0,1-1 MHz) a sejtek mérete elkülöníthető, azonban az azonos méretű, de különböző dielektromos tulajdonságokkal rendelkező sejtek nem különíthetők el egymástól, 2-10 MHz tartományban pedig a sejtmembrán struktúráját lehet vizsgálni. Eukarióta sejtek esetében magas frekvencia értéken (10-30 MHz) a sejtalkotók tanulmányozhatók.

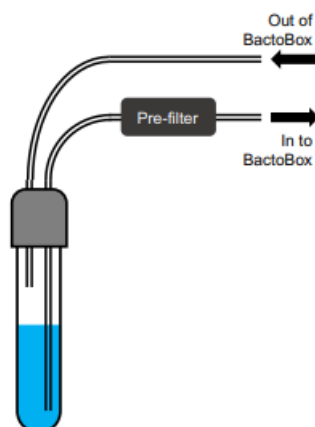
A BactoBox mérőműszer a sejtmembrán összetételt vizsgálja, a különböző baktériumfajok között nem tud különbséget tenni.

A készülék kezelése egyszerű, 4 gombbal (Measure, Stop, Empty, Clean) működtethető, amely a 3.ábrán látható. A képernyőn a folyamatban levő mérés-, és a mérési eredményről kapott információk jelennek meg. A mérés folyamán a mérendő sejtuszpenzióból a készülék egy műanyag flakonból szívja fel a mintát megfelelő mennyiségben egy műanyag csőrendszeren keresztül (4.ábra), ahonnan

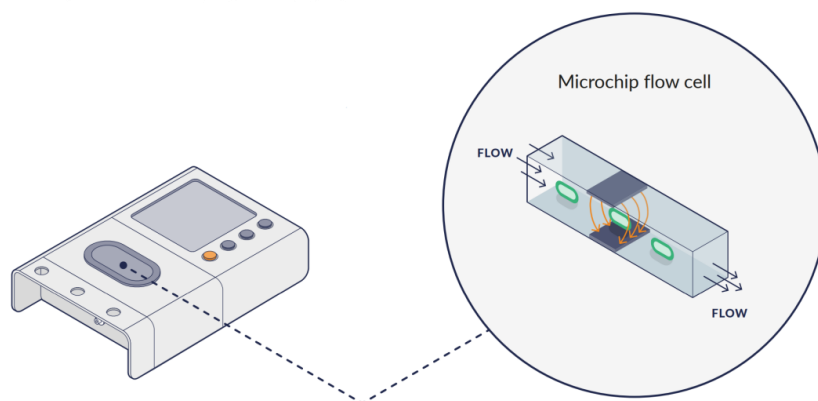
a szuszpenzió az ún. áramlási cellába jut (4.ábra). Itt a sejtek vékony kapillárison keresztül áramlanak át a detektoron, ami a minta vezetőképességében bekövetkező változásokat méri (Berstelten, 2021).



3.ábra: BactoBox mérőműszer (Berstelten, 2021)

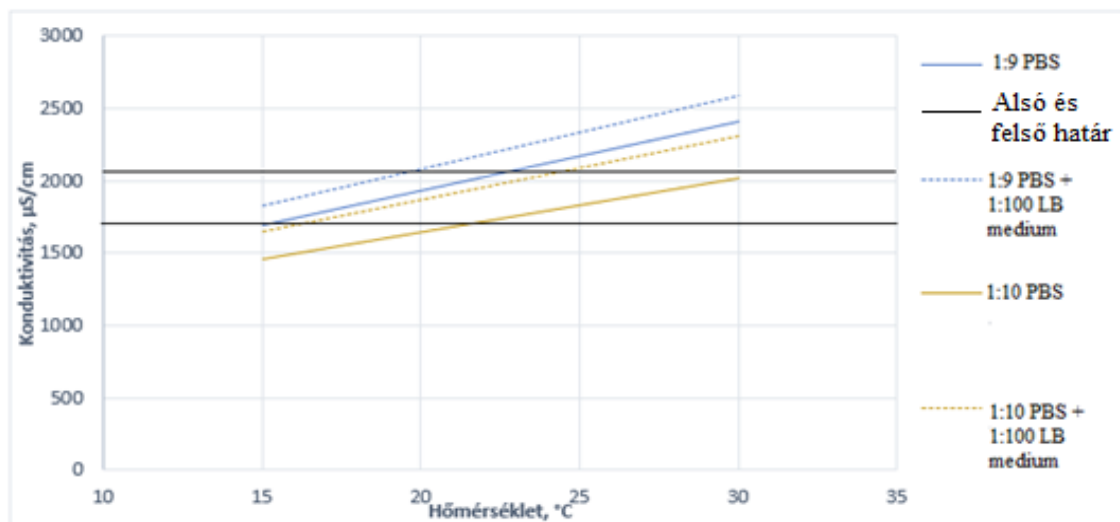


4.ábra: Minta felvételének folyamatábrája (Berstelten, 2021)



5.ábra: A áramlási cella rendszerben áramló folyadék összetételének monitorozása
(Berstelten, 2021)

A mérőműszer optimális mérési tartománya $10^4 - 2 \cdot 10^6$ élő sejt/ml közötti érték, ezért fontos a minta megfelelő hígítása, továbbá a hígító folyadék vezetőképessége is meghatározó, aminek ideális tartománya 1700-2100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ez teszi lehetővé a rendszer számára a baktériumok megkülönböztetését más részecskéktől, különbséget tesz az ép sejtek belsejében található citoplazma iontartalma és a baktériumot kívülről körülvevő közeg iontartalma között. Befolyásolhatja a mérést a hígító folyadék hőmérséklete, ugyanis a hőmérséklettel a vezetőképesség megváltozik. A különböző hígító pufferek hőmérséklet-függését a 6.ábra szemlélteti.



6.ábra: 1:9 PBD és 1: 10 PBS puffer oldat konduktivitásának ábrázolása a hőmérséklet függvényében
1700-2100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ konduktivitási határértékekkel szemléltetve

3.3.2.2 FELHASZNÁLÁSI TERÜLETE

A BactoBox hasznos eszköz azon vállalatok számára, amelyek baktériumokat állítanak elő „termékként” (pl. starterkultúrák, probiotikumok, bakteriális vakcinák stb.) valamint, amelyek mikroorganizmusokat használnak „gyártásra” pl. biofelületaktív anyagok, aminosavak, enzimek előállításához. A gyors és pontos baktériumszám meghatározás létfontosságú a fermentációs folyamatok megismeréséhez és a megfelelő baktériumtiter eléréséhez. A gyors élő sejtszám-meghatározásnak még a liofilizált bakteriális vakcinák előállításánál is óriási jelentősége van: konzisztens minőségű termék előállításához a liofilizálás előtt elengedhetetlen a szuszpenzió megfelelő élő sejtszámának beállítása. Amennyiben ez a hagyományos tenyésztési módszereken alapul, a baktériumkoncentráció beállítása akár több nappal korábbi eredmény alapján történik, ez idő alatt a tenyészet azonban valójában pusztulásnak is indulhat. Ha sikerül azonnali információt kapnunk a tenyészet intakt sejtszámáról, az hozzájárulhat az állandó, megbízható minőségű termék előállításához, vagyis végeredményben a termék gazdasági sikerességéhez is.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 VIZSGÁLT BAKTÉRIUM

Kísérletem során a Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt. tulajdonában lévő *Salmonella* Typhimurium törzzsel dolgoztam.

4.2 ANYAGOK

- Pufferolt pepton víz (NaCl-Peptide Puffer), Merck, katalógusszám: 146395
- Foszfáttal pufferolt sóoldat (PBS), Sigma, katalógusszám: D8537, XLOT RNBK3734
- 70%-os izopropil-alkohol, Sigma, katalógusszám: I9516
- steril injekciós víz (WFI, Water for Injections)
- Trypton szója agar, Millipore, katalógusszám: 146004

4.3 ESZKÖZÖK

- BactoBox mérőműszer - BB1 6-os verzió prototípus (SBT Instruments)
- 15 ml-es műanyag centrifuga csövek a hígításokhoz, steril
- 15 ml-es műanyag BactoBox csövek a mérésekhez, steril
- Mérőhenger, steril
- Centrifuga
- Kesztyű
- Automata pipetta
- Laborhőmérő
- Mikrocentrifuga-csövek Brand, katalógusszám: BR780400

4.4 MÓDSZEREK

4.4.1 SZÉLESZTÉSES SEJTSZÁMBECSLÉS

A módszer kivitelezése során a mikroorganizmusokat tartalmazó mintából szuszpenziót, majd a kiindulási élő sejtszámtól függően 2,5x-es, 5x-es vagy 10x-es (decimális) léptékű hígítási sorozatot készítettem, figyelembe véve, hogy a lemezre kioltott telepek száma a megfelelő tartományba essen, így tehát a legtöményebb kb. 100-200 közötti telep, a középső 30-100 közötti telep, a leghígabb tagból pedig legalább 30 telep került kioltásra. Az egyes átoltasok között a mintákat homogenizáltam. A hígítási sorozat megfelelő tagjaiból 100-100 µl-t TSA (trypton szója agar) táplemezekre szélesztettem. Az inkubációs idő letelte után (jellemzően 24 óra, 37 °C-on) a kifejlődött baktériumtelepeket

megszámoltam, majd a mintában található mikrobakoncentrációt a lemezen megjelent telepek számának és a hígítás mértékének szorzataként előállított CFU/ml (telepképző egység/ml) mértékegységben kifejezve közöltem. Az egyes minták 3 különböző hígításából kapott eredményekből jellemzően azokat vettem figyelembe, melyek 10 és 300 közé estek, ezekből átlagot képeztem, így meghatároztam a mintára jellemző átlagos mikrobakoncentrációt.

4.4.2 ÉLŐ SEJTSZÁM-MEGHATÁROZÁS IMPEDANCIA MÉRÉSEN KERESZTÜL

Az impedancia mérés elvén a BactoBox (BB) az egyenként mért sejteket extrapolálja a mintában lévő sejtkoncentráció becsült értékére, ezért a statisztikai bizonytalanság alacsonyabb koncentrációknál nagyobb. A műszer a 10.000 és 2.000.000 intakt/élősejt/mL (ICC/mL) közötti tartományban működik megbízhatóan. Pl. 1×10^9 CFU/mL becsült sejtszám esetén 1000x-2000x-10000x hígítást alkalmaztam. Az így várt mért értékek rendre: 1×10^6 ICC/mL, 5×10^5 ICC/mL és 1×10^5 ICC/mL. Tapasztalatok alapján (lásd a robusztusság-vizsgálatnál) ezen a tartományon legalább 2 (de inkább 3) hígításból érdemes meghatározást végezni. A hígítási tagok által kapott sejtszám értékeket átlagoltam, így a valóságot legjobban megközelítő ép sejtszám értékeket kapva.

4.4.3 PUFFER OLDATOK OPTIMÁLIS HŐMÉRSÉKLET ÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA

Mivel a 3.3.3.1. fejezetben bemutatottak alapján a BactoBox mérőműszer egy meghatározott konduktivitási tartományban (1700-2100 $\mu\text{S}/\text{cm}$) szolgáltat csak megbízható eredményt, szükség volt a különböző hígító pufferek fajlagos vezetőképességének vizsgálatára a hőmérséklet függvényében. A következő puffer oldatokat vizsgáltam: 1:11 PBS (Phosphate Buffered Saline) (10 ml PBS + 100 ml WFI), 1:10 pufferelt pepton víz (10 ml pufferelt pepton víz + 90 ml WFI) és 1:9 (10 ml pufferelt pepton víz + 80 ml WFI) hígítási arányokban. Az optimális hőmérséklet meghatározásához a három különböző hígító folyadékkal 3 egymástól független mérést végeztem. A különböző puffer oldatok mindegyikét az alábbi hőmérsékleti értékekre ($^{\circ}\text{C}$) állítottam be: 0-15 $^{\circ}\text{C}$, szobahőmérséklet (23,5 $^{\circ}\text{C}$) és 28 $^{\circ}\text{C}$.

A kísérlet kivitelezése során a 0-15 $^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet eléréséhez hűtőszekrénybe helyeztem a mintákat, az inkubáláshoz pedig laboratóriumi vízfürdőt használtam, ahol a vízfürdő-hőmérsékletének digitális beállítása során biztosítható volt a minták állandó 28 $^{\circ}\text{C}$ -on tartása. A hűtőszekrényben tárolt pufferek hőmérsékletét a mérés után közvetlenül ellenőriztem, hogy vezetőképességüket azok pontos hőmérsékletének függvényében tudjam ábrázolni (a mért értékek: 8,15 $^{\circ}\text{C}$; 10,95 $^{\circ}\text{C}$; 9,9 $^{\circ}\text{C}$).

4.4.4 STATISZTIKAI MÓDSZEREK

4.4.4.1 KÉTMINTÁS T-PRÓBA

A kétmintás t-próba lehetővé teszi két adathalmaz átlagértékeinek összehasonlítását a próbastatisztika kiszámításával. A kiszámított T-érték abszolút értékét össze kell hasonlítani a kiválasztott szignifikancia szinthez tartozó kritikus t-értékkel (amely statisztikai táblázatokból kiolvasható vagy Excel segítségével megkapható). Ha a számított T-érték abszolút értéke nagyobb vagy egyenlő a kritikus t-értékkel, akkor az adatsorokat statisztikailag különbözőnek nyilvánítjuk. A kétmintás t-próba nullhipotézise (H_0) az, hogy két adathalmaz átlagértékei megegyeznek, ellenhipotézise (H_1) pedig, hogy különbözőnek. Ha p érték kisebb, mint az előre meghatározott szignifikancia szint (általában ez 0,01 vagy 0,05), akkor a próba eredménye szignifikáns különbséget jelez, tehát elvethetjük a nullhipotézist (H_0) és az alternatív hipotézist használjuk, ha p érték nagyobb, akkor a próba nem eredményez szignifikáns eltérést – megtartjuk a nullhipotézist (Ittész, 2020a).

A kétmintás t-próba statisztika képletei abban az esetben, ha a két alapsokaság szórása egyenlő (t , S^2) és ha a két alapsokaság szórása nem ismert ($t^{(Welch)}$).

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S^2 \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} ; S^2 = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} ; t^{(Welch)} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)}}$$

A képletekben $\bar{X}_1$ és $\bar{X}_2$ az 1. és 2. csoport átlagértékei, S az ún. összevont szórásnégyzet, és n_1 és n_2 az egyes csoportok elemszámai.

4.4.4.2 LINEÁRIS REGRESSZIÓ

A regressziószámításnál függvényszerű kapcsolatot keresünk egy vagy több független (magyarázó) változó(k)ra és egy válaszváltozóra (függő) (Ittész, 2020b).

A becslés alapja a legkisebb négyzetek elve, ami a hiba négyzetösszeget minimalizálja. A linearitás feltételei nem olyan szigorúak, például egy több változóból álló függvény megfelelő transzformációval lineárisra tehető. A determinációs együttható, vagyis az R^2 érték a modell pontosságát mutatja meg vagyis a korrigált illeszkedési helyességére világít rá. Ha a meredekség 0, akkor a determinációs érték is 0 értéket vesz fel, ami azt jelenti, hogy a változók között nincs kapcsolat. Minél jobban közelít az 1 értékhez, annál szorosabb a korreláció a változók között (Ittész, 2020b).

Az egyváltozós lineáris regresszió általános modell (1.) és a többszöröslineáris regresszió (2.):

$$(1.) Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

ahol a β_0 az elméleti regressziós konstans (tengelymetszet), a β_1 az elméleti regressziós együttható, ε a véletlen hibatag.

$$(2.) \quad Y = \beta_0 + \beta_1 X + \dots + \beta_p x_p + \varepsilon$$

ahol Y a függő változó, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ a regressziós együtthatók és $x_1, x_2, \dots, x_n$ a modell független változói. A hibatagnak (ε) normális eloszlásúnak kell lennie $E(\varepsilon) = 0$ és állandó szórást kell követnie $\text{Var}(\varepsilon) = \sigma$.

4.4.4.3 VARIANCIAANALÍZIS

Az ANOVA és a regresszió tulajdonképpen statisztikailag ekvivalensek, mindkettő módszer általános lineáris modellek illesztésére vezethető vissza. Ugyanazt a megoldást fogják válaszul adni (feltéve, ha a két módszerrel ugyanazt a hipotézist teszteljük). A regresszióelemzés rugalmasabb megközelítés, mivel több adatelemzési helyzet típusra terjed ki (pl. folytonos független változók), míg a varianciaanalízis során jellemzően nemfolytonos független változók hatását vizsgáljuk egy folytonos függő változóra (Newsom, 2021). A varianciaanalízist gyakran olyan hipotézisek tesztelésére alkalmazzuk, amelyek a kísérlettervezésben és a minőségellenőrzésben felmerülhetnek. Kettőnél több sokaság középértékeinek minta alapján történő összehasonlítására is alkalmazható, szemben a kétmintás t-próbával, ami két alapsokaság átlagértékeit hasonlítja össze. Azt vizsgálja, hogy egy adott „kezelés” befolyásolja-e az adott tulajdonságot, vagyis a folytonos válaszváltozó értékét. A varianciaanalízis segítségével olyan típusú kérdésfeltevésekre kereshetünk választ, mint a „van-e különbség a csoportok között egy adott változóban?”, illetve „van-e hatása a vizsgált (kvalitatív) tényezőnek egy adott változóra?” (Bolla *et al.*, 2013).

A varianciaanalízis elvégzésének előfeltételei a következők:

- a minták függetlenek legyenek, normális eloszlású sokaságból származzanak
- azonos legyen a csoportok varianciája
- abban az esetben, ha közel azonosak a minták elemszámai, a legnagyobb varianciának kisebbnek kell lennie, mint a legkisebb variancia kétszerese.

A középértékre vonatkozó hipotézisek: A nullhipotézise az, amikor a kezelések átlaga egyenlő, a csoportokon belül nincs különbség. (Bolla *et al.*, 2013; Kriszt *et al.*, 1997).

A H_0 -t elfogadjuk, ha $F_{\text{számított érték}} \leq F_{\text{táblázatbeli érték}}$.

A p érték esetében, ha $p < 0,05$ a nullhipotézist 5%-os szignifikanciaszint mellett elvetjük, ennek alapján a csoport várható értékei nem tekinthetők azonosnak, illetve, ha $p \geq 0,05$ a nullhipotézist megtartjuk.

Amennyiben a nullhipotézis teljesül, tehát minden csoportban azonos szórás és várható érték szerepel, akkor a kezelés okozta variancia (MS_B) nem lehet nagyobb a véletlen hatása okozta varianciánál (MS_W). Ha nagyobb, a nullhipotézist el kell vetni, amiből az következik, hogy a minta nem homogén (Ittész, 2020b).

4.4.4.4 TOST EKVIVALENCIA TESZT (TWO ONE-SIDED T-TEST)

A kétmintás t -próba alternatívája a TOST, amelyet kifejezetten gyógyszeripari termékek bioekvivalencia-vizsgálatára terveztek. A közelmúltban kiterjesztették szélesebb körű alkalmazásokra a gyógyszerészeti tudományokban, a folyamatmérnöki tudományokban, a pszichológiában, az orvostudományban, a kémiában és a környezettudományokban. A statisztikai ekvivalencia-probléma eldöntésére a két egyoldali teszten alapuló TOST eljárást használják. A TOST nullhipotézise az, hogy a két vizsgált csoport átlagértékei nem ekvivalensek, majd azt próbálja bizonyítani, hogy egy előre meghatározott határon belül az átlagok egyenértékűnek tekinthetők; ez koncepcionálisan ellentétes a kétmintás t -teszt eljárásával. Az analitikai területen is gyakran alkalmazott statisztikai eljárás esetén a mérési módszer előzetes ismerete, és/vagy a tervezett alkalmazási terület függvényében elsőként egy elfogadási kritériumot, azaz egy ekvivalenciatartományt (θ) kell felállítani. Ezután ki kell számolni a két csoport átlagértékének különbségére vonatkozó $100(1-2\alpha)\%$ -os konfidenciaintervallumot, és azt kell megvizsgálni, hogy ez a konfidenciaintervallum milyen viszonyban van az ekvivalenciatartománnyal. Ha a konfidenciaintervallum teljes mértékben a $[-\theta, \theta]$ intervallumon belül van, akkor a két adatsor átlagértékei ekvivalensek (Limentani *et al.*, 2022; Internet 3).

4.4.5 VEZETŐKÉPESSÉG VIZSGÁLATA ELTÉRŐ HŐMÉRSÉKLETI ÉRTÉKEKEN

A hígító folyadék vezetőképessége meghatározó a BactoBox működése szempontjából, mivel csak 1700-2100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ közötti tartományon belül képes mérni a mintákban levő sejteket. Az ideális vezetőképesség méréshez nem az elektródával, hanem a közeg hőmérséklet-függésével kell korrigálni.

A vizsgálat során 8-10 °C között, 23 °C-on és 28°C-on végeztem meghatározásokat.

Négy egymástól eltérő összetételű és koncentrációjú puffer oldat (1:9, 1:10 PBS és 1:9, 1:10 pufferolt pepton víz) vezetőképességét vizsgáltam, hogy kiválasszam a legmegfelelőbbet a mérőműszer szempontjából.

4.4.6 AZ IMPEDANCIA MÉRÉSEN ALAPULÓ ÉLŐ SEJTSZÁM-MEGHATÁROZÁSI MÓDSZER ANALITIKAI TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐINEK VIZSGÁLATA

4.4.6.1 ROBUSZTUSSÁG VIZSGÁLAT

A módszer eredményét potenciálisan befolyásoló kisebb, a napi operatív működés szempontjából releváns változások hatásáról ad információt. Az elemzés zavartűrését a módszer paramétereinek szándékos megváltoztatásán keresztül vizsgáltam (különböző összetételű pufferek, különböző arányú mintahígítások) a minta mért élősejtszámára nézve.

Teljes faktoriális kísérleti elrendezésben (2^3) vizsgáltam három különböző pufferrel három különböző hígítási léptékben (500x, 1000x és 2500x) a kapott eredményeket. A tesztelt pufferek a PBS 1:10 (10 ml PBS + 90 ml WFI) illetve, a 1:10 pufferelt pepton víz (10 ml pufferelt pepton víz + 90 ml WFI) és 1:9 (10 ml pufferelt pepton víz+ 80 ml WFI) voltak. Pufferenként egy párhuzamos mintaelőkészítést végeztem, amelynek a megfelelő hígítási tagjaiból 3-3 ismételt leolvasást végeztem a készülékkel.

A kísérlet során kapott eredmények varianciaanalízis segítségével értékelhetők. A faktoriális kísérleti elrendezés lehetővé teszi, hogy az egyes faktorok kölcsönhatásait is vizsgáljuk. Amennyiben nem mutatható ki szignifikáns kölcsönhatás, a lineáris modellből a kölcsönhatástag elhagyható, így a modell finomítható.

A módszert akkor tekinthetjük robusztusnak, ha nem mutatható ki szignifikáns különbség ($p \geq 0,05$) a vizsgált faktorok (hígítás, puffer) szintjei között.

4.4.6.2 A MÓDSZER PRECIZITÁSI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA

4.4.6.2.1 OPERÁTOROK KÖZÖTTI PONTOSSÁG

A vizsgálaton belüli precizitás azt írja le, hogy mennyire hasonlóak az eredmények, ha más operátor végzi a kísérletet ugyanazzal a módszerrel, azonos mintán, azonos reagenssel, ugyanabban a laboratóriumban. A cél tehát az operátor hatásból bekövetkező változások értékelése.

A kivitelezés során ebben a vizsgálatban két operátor vett részt, mindketten 1:10 hígítású, $0,2 \mu\text{m}$ átmérőjű membránon átszűrt PBS oldatot használva, ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazzal a mérőműszerrel mérve. Párhuzamosan kivitelezve a két mérést operátoronként 1-1 mintaelőkészítés (1-1 hígítási sor) során a mintából 6-6 független-sejtszám érték került meghatározásra 3 különböző hígítási léptékkel (750x, 2000x, 10000x). A három különböző hígításból mért sejtszám átlagából

kapott érték adott egy sejtszám eredményt, ez tehát összesen operátoronként 18 (6x3) leolvasást és 6 sejtszám eredményt jelentett ugyanabból a mintából.

Az ekvivalencia eldöntésére a két egyoldali teszten alapuló TOST eljárást használtam. Azt vizsgáltam, hogy az átlag értékekből kiszámított konfidenciaintervallum százalékos értékei kisebbek vagy nagyobbak-e az előre meghatározott $\pm 10\%$ -os ekvivalencia tartománynál.

4.4.6.2.2 VIZSGÁLATON BELÜLI PRECIZITÁS VIZSGÁLATA

Az vizsgálaton belüli precizitás vizsgálata a mérőműszernek tulajdonítható variabilitásról nyújt információt az ismételt mérések eredményéből variancia-együtthatón keresztül, amelyet a kapott adat-sor sztenderd deviációjának és átlagának hányadosaként lehet meghatározni.

A módszer vizsgálaton belüli precizitásának értékelését az operátorok közötti pontosság vizsgálatához végzett kísérlet eredményei alapján végeztem. Operátoronként 1-1 mintaelőkészítés (1-1 hígítási sor) során a mintából 6-6 független-sejtszám érték került meghatározásra 3 különböző hígítási lép-tékben (750x, 2000x, 10000x). Mindkét operátorra kiszámítható egy-egy CV érték, amely jellemzi a módszer vizsgálaton belüli precizitását.

Az vizsgálaton belüli precizitás elfogadásának feltétele az, hogy a mért eredmények CV értéke nem haladhatja meg a 10%-ot ($CV \leq 10\%$).

4.4.6.2.3 VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI PRECIZITÁS

A vizsgálatok közötti precizitás azt írja le, hogy az ugyanazon napon, ugyanazon operátor által el-végzett, többszörösen ismételt (független) mérési eredmények mennyire hasonlóak, vagyis magának a mérési módszernek tulajdonítható variabilitásról nyújt információt. Ennek jellemzésére szintén a variancia-együtthatót (CV) szoktuk alkalmazni

A kísérletben 6 párhuzamosan (függetlenül) előkészített hígítási sorozatot állítottam elő majd ezt kö-vetően 3 hígítási tagból végeztem a leolvasást (750x, 2000x, 10000x). Egy mérési eredmény 3 füg-getlen leolvasás átlagának számításából származik.

A vizsgálatok közötti precizitást akkor tekintettem elfogadhatónak, ha a CV értéke nem haladta meg a 15%-ot ($CV \leq 15\%$).

1.táblázat: A becsült sejtszám alapján meghatározott hígítások

Minta becsült élő sejtszáma [ICC/mL]	Hígítás [-]	Várt élő sejtszám [ICC/mL]
1,00E+09	750	1,33E+06
	2000	5,00E+05
	10000	1,00E+05

4.4.6.3 SPECIFIKUSSÁG VIZSGÁLAT

Specifikusság az analitikai módszer azon képességére utal, hogy mennyire képes megkülönböztetni és mennyiségileg meghatározni az analitot az adott mintamátrixban. A mérés során azt vizsgáltam, hogy a módszer milyen mértékben képes a megadott 2.táblázat alapján összekevert mintákból az ép sejteket – az elegyítési aránynak megfelelően – számszerűsíteni, vagy másképpen megfogalmazva, mennyire specifikus a módszer az élő sejtszám meghatározására.

A mintát két részre osztottam, amelynek egyik felét izopropil-alkohollal inaktiváltam, a másik felét érintetlenül hagytam. Az élő sejtes (kezeletlen) és a holt sejtes (alkohollal kezelt) baktériumszuszpenziók előállításának lépései a következők:

1. Az 1 mL-es baktériumtenyészethez 1 mL 0,85 %-os NaCl oldatot adtam, amiből elegyítés után 1-1 mL-t Eppendorf csövekbe pipettáztam. A sejtek összegyűjtéséhez a mintákat centrifugáltam (15000 g 2 perc). A centrifugálás során a sejtek az Eppendorf cső aljára ülepedtek, az apróbb törmelékek a felülúszóban maradtak.
2. Az első minta esetében (ez lesz az élősejtes szuszpenzió) a felülúszót leöntöttem majd a pelletet 1 mL 0,85 %-os NaCl oldatban reszuszpendáltam.
3. A második minta esetében (ez lesz az elölt sejtes szuszpenzió) szintén leöntöttem a felülúszót, de itt 70 %-os izopropil-alkoholban reszuszpendáltam a leülepedett sejteket. 30 percig állni hagytam a mintákat.
4. Újabb centrifugálás következett (15000 g, 2 perc).
5. Egyetlen mosási lépés általában elegendő szokott lenni a zavaró komponensek eltávolításához. Mindkét mintáról leöntöttem a felülúszót, majd mindkét minta esetében a sejteket 1-1 mL 0,85 %-os NaCl oldatban reszuszpendáltam.
6. Ezután ismét centrifugáltam a mintákat (15000 g, 2 perc).
7. Ezt követte a felülúszó leöntése és a minták reszuszpendálása 1 mL 0,85%-os NaCl oldatban.

Az élő- és elölt sejtes szuszpenziókat a 2.táblázat szerint elegyítettem:

2.táblázat: Élő- és holt sejtek elegyítési aránya

Az élő:elölt sejtek aránya	Élő sejtes szuszpenzió	Elölt sejtes szuszpenzió
0:100	0 ml	1,00 ml
25:75	0,25 ml	0,75 ml
50:50	0,50 ml	0,50 ml
75:25	0,75 ml	0,25 ml
100:0	1,00 ml	0 ml

Mind az öt mintát három különböző hígítási lépték (750x, 2000x, 10000x) szerint hígítottam, majd ezeknek az átlagával számolva megkaptam minden minta esetében a mért sejtszámot. A mért eredményeket az elméleti (számolt) értékekkel hasonlítottam össze, amelyet a 100%-os élő sejtszám eredményből számoltam ki figyelembe véve az inaktivált sejtekkel való hígítás mértékét a 3.táblázat szerint).

3.táblázat: Kísérleti elrendezés a specifikussági vizsgálathoz

Élő sejtszám arány [%]	Elölt sejtszám arány [%]	Becsült érték [ICC/ml]
0	100	0,00·100% élő sejtszám
25	75	0,25·100% élő sejtszám
50	50	0,50·100% élő sejtszám
75	25	0,75·100% élő sejtszám
100	0	1,00·100% élő sejtszám

Az összehasonlítás alapja a visszanyerési százalék volt, amit a következő képlet alapján számoltam ki:

$$R(\%) = \frac{\text{Mért ép sejtszám}}{\text{Becsült ép sejtszám}} \cdot 100$$

A specifikusság a következő elfogadási feltételek mellett teljesül:

- a visszanyerés (Recovery) minden szinten 80-120% közötti tartományba esik
- a 100%-ban inaktivált minta eredménye a meghatározási határ (LOQ) alá esik (~1000 ICC/ml)
- lineáris regresszió determinációs együtthatója: $R^2 \geq 0,9000$.

4.4.6.4 LINEARITÁS VIZSGÁLAT

A linearitás a módszer azon képességét jelöli, amikor a mért analitikai jel (közvetlenül a vezetőképesség, származtatva pedig az élő sejtszám) az analit koncentrációjával (szuszpenzió várható élő sejtszámával) egyenes arányban áll, tehát a két együtt változó mennyiség közötti kapcsolatot fejezi ki. Igazolni kell, hogy egy adott – a tényleges analitikai feladatnak megfelelő – mérési tartományban a módszer lineáris, ezt különböző koncentrációjú minták elemzésével határoztam meg. A linearitás vizsgálat kivitelezése során hígítási sort készítettem (előhígítás) 0x-10000x közötti tartományon belül. Figyelembe véve a várható sejtszámot a további hígításokat úgy végeztem el, hogy a mért sejtszám $1 \cdot 10^5$ - $1,5 \cdot 10^6$ ICC/mL közötti tartományon belül legyen (ezeket a hígítási értékeket a 4.táblázat szemlélteti). A 3 további hígítási tag mérésének eredményéből visszaszámolt mintasejtszámok átlaga ad 1-1 sejtszám-értéket. A mért élő sejtszám értékek tízes alapú logaritmusát ábrázoltam a várható élő sejtszámok tízes alapú logaritmusának függvényében és lineáris regresszió segítségével egyenest illesztettem az értékekre. A névleges sejtszám értékeket a legtöményebb mintából meghatározott élő sejtszám alapján számoltam ki.

A linearitást akkor tartottam elfogadhatónak, ha a korrelációs együttható (R) értéke legalább 0,95 volt, illetve a modell hibatagjai véletlenszerűen oszlottak el az illesztett egyenes körül. A kísérleti elrendezést a 4.táblázat szemlélteti.

4.táblázat: Kísérleti elrendezés a linearitás vizsgálatához

Előhígítás	További hígítások
0	750
	2000
	10000
10	75
	200
	1000
100	7,5
	20
	100
1000	10
10000	0

4.4.6.5 PONTOSSÁG VIZSGÁLAT

A pontosság azt fejezi ki, hogy a mérési eredmény mennyire közelíti meg a valódi értéket. Egy analitikai eljárás pontossága az elfogadott referenciaérték (pl. a referencia módszerrel mért eredmény) és

a validálandó vizsgálattal mért érték közötti egyezés szorosságát fejezi ki. Ebben az esetben a BactoBox mérőműszer mérési pontosságát tanulmányoztam *Salmonella* tenyésztésre és a rutinban alkalmazott referencia módszer, vagyis a hagyományos telepszámlálási módszerrel kapott eredményekkel vetettem össze a kapott értékeket.

5. táblázat: Szuszpenzió hígítása

Előhígítás	Névleges koncentráció szint
5	100 %
10	50 %
15	33,3 %

A különböző előhígításokat (5x, 10x, 15x) a módszer szempontjából ideálisnak vélt mérési tartománynak megfelelően tovább hígítottam, ez összesen 3 független hígítási sort eredményezett. Mindkét módszerrel meghatároztam az élő sejtszámot a megfelelő hígítású mintákból. BactoBox-szal 3-3 ismételt leolvasást végeztem, szélesztés esetén pedig 3 független lemezre oltást (3 x 3 lemez mintánként). A vizsgálat kivitelezése során mintánként haladtam, nem módszerenként, így elkerülhetővé vált a tenyésztés időbeli pusztulásából adódó félrevezető eredmények gyűjtése.

A pontosság-vizsgálatot két különböző alkalommal is megismételtem.

Az eredményeket kétféle megközelítéssel értékeltem:

1. Lineáris regresszióval egyenest illesztettem a különböző hígításokból, a két módszerrel mért adatokra – a diagram két tengelyén a két módszerrel mért eredményeket ábrázoltam. Az értékelés során azzal a feltételezéssel éltem, hogy amikor az egyik módszerrel 0 (CFU/mL vagy ICC/mL) élő sejtszámot mérek, akkor a másik módszerrel is, vagy másképpen megfogalmazva a módszerek között egy olyan lineáris összefüggés állítható fel, amely nem tartalmaz konstans tagot (tengelymetszete az origó). Ebben az esetben regressziós egyenest (egyenes meredeksége) utal a BactoBox módszer pontosságára a lemezszámlálási módszer eredményéhez viszonyítva. Amennyiben ez 1 körül van (ideális esetben =1), a két módszerrel pontosan ugyanazt az eredményt kapom. Ellenkező esetben (amikor a meredekség nem egyenlő 1-gyel) egy korrekciós faktor állítható fel a két módszer között.
2. Lineáris regresszió alapú megközelítés mellett TOST ekvivalencia teszt segítségével is kiértékeltem az adatokat. Ebben az esetben általános lineáris modellt illesztettem az eredményekre. A válaszváltozó a mért élő sejtszám volt (ICC/mL vagy CFU/mL), a magyarázó változó pedig az alkalmazott módszerek. Ennek a változónak két szintje volt: a szélesztéses

módszer, valamint a BactoBox módszer. A modell regressziós együtthatója megegyezik a két adatsor átlagainak különbségével. A modellre kiszámítottam a 90%-os konfidenciaintervallumot, és azt vizsgáltam, hogy ez benne van-e az előre meghatározott ekvivalencia-tartományban ($\pm\theta$).

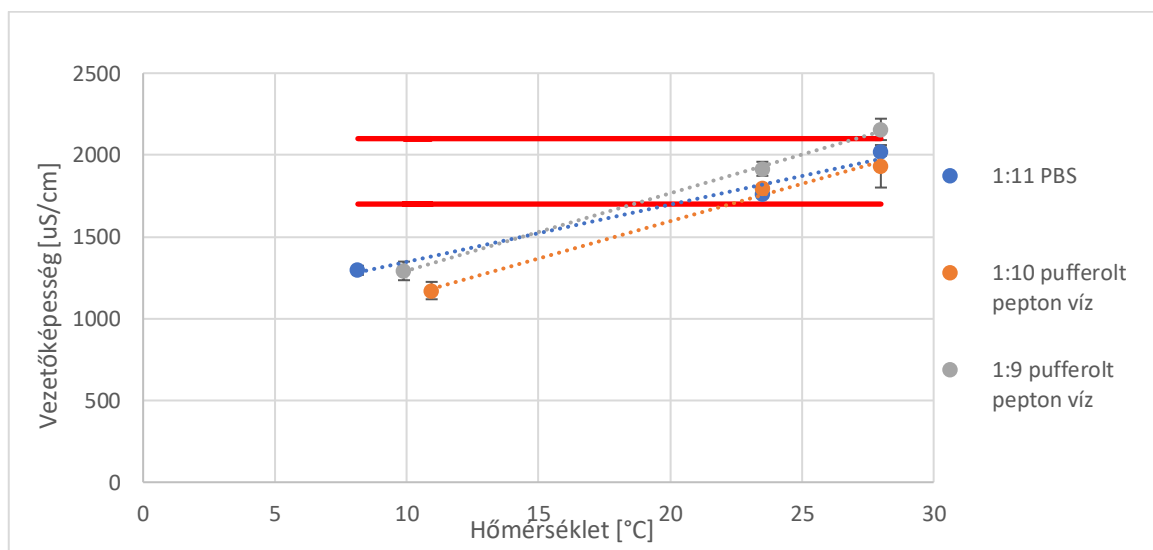
Akkor tekintettem elfogadhatónak a módszer pontosságát, ha:

- az illesztett egyenes regressziós együtthatója 0,8 és 1,2 közé esett (figyelembe véve az illesztett modell illeszkedését, megbízhatóságát is)
- vagy, ha $\pm 10\%$ határon belül ekvivalensnek bizonyult a két módszer

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 VEZETŐKÉPESSÉG A HŐMÉRSÉKLET FÜGGVÉNYÉBEN

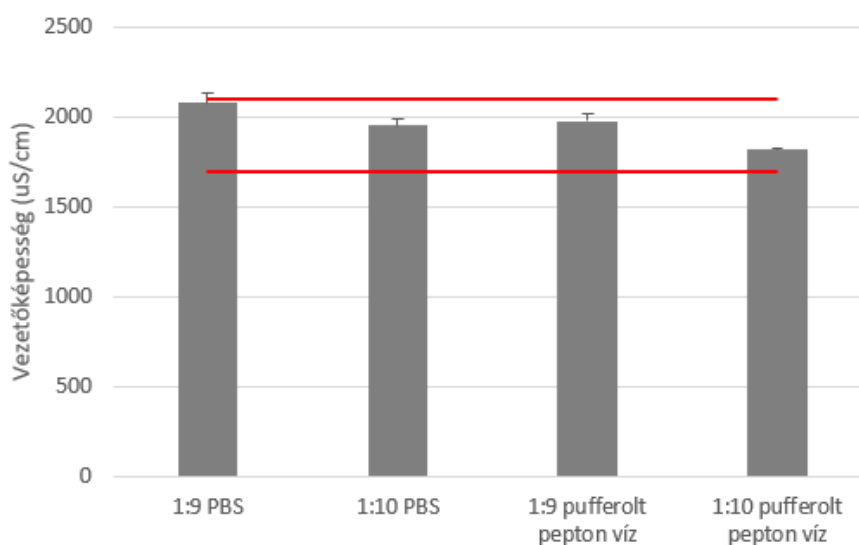
Az 1:11 PBS, 1:9 és 1:10 pufferolt pepton víz puffer oldatoknál megvizsgáltam, hogy miként befolyásolja a vezetőképességet a hőmérséklet, ezáltal információt kaptam arról is, hogy hol érdemes a puffer oldatokat tárolnom a mérés előtti órákban (hűtőszekrényben, szobahőmérsékleten vagy vízfűtőben szobahőnél melegebb környezetben).



7.ábra: Fajlagos elektromos vezetőképesség (konduktivitás) a hőmérséklet függvényében

A hőmérséklet emelésével a vezetőképesség értéke is nő, ami a 7.ábráról jól leolvasható. A felső- és alsó határérték berajzolása (piros párhuzamosan futó vízszintes vonalak) jól szemlélteti, hogy a szobahőmérsékleten mért minták esetében kaptam a méréshez megfelelő konduktivitás értékeket mind a három puffer oldatnál.

Szobahőmérsékleten vizsgáltam tovább a különböző összetételű és koncentrációjú minták (1:9, 1:10 PBS és 1:9, 1:10 pufferolt pepton víz) vezetőképességét, majd kiválasztottam a mérőműszer működéséhez a legmegfelelőbbet.



8.ábra: Puffer oldatok vezetőképesség értékei szobahőmérsékleten vizsgálva

Az 8.ábrán látható, hogy a szórások figyelembevételével három hígító folyadék vezetőképesség értéke esett az elfogadási tartományon belülre (1700-2100 µS/cm). Ezért ezek közül csak három került további vizsgálatra: az 1:10 PBS, 1:9 és 1:10 pufferolt pepton víz. Az 1:9 PBS puffer oldat vezetőképesség értékét nem találtam megfelelőnek, így a további vizsgálatokból kizártam

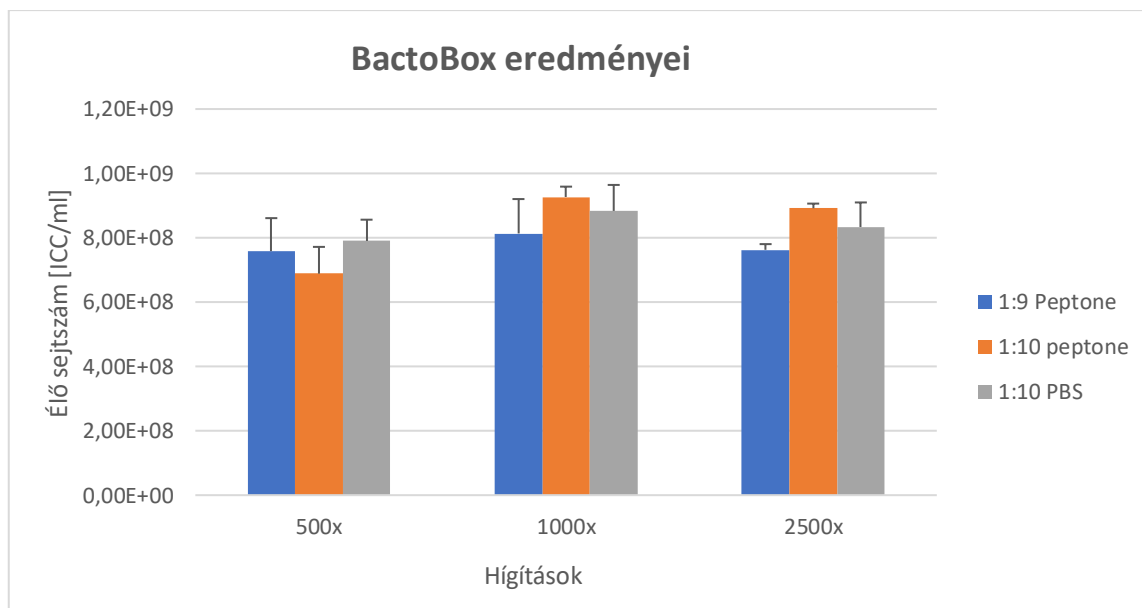
5.2 A BACTOBOX BAKTÉRIUM SEJTSZÁMLÁLÓ MÉRŐMŰSZER ANALITIKAI PARAMÉTEREINEK KIÉRTÉKELÉSE

5.2.1 ROBUSZTUSSÁG VIZSGÁLAT EREDMÉNYE

Az robusztusság vizsgálata során a különböző paraméterek szándékos megváltoztatásával a módszer azon képességét szerettem volna bebizonyítani, hogy megbízhatóan működtethető a kismértékű zavaró hatások ellenére is.

Három különböző összetételű és hígítású puffer hatását vizsgáltam meg a mért élő sejtszámra nézve teljes faktoriális kísérleti elrendezésben. A 9.ábra szemlélteti a kapott sejtszám értékeket. Az eredményeket kéttényezős varianciaanalízis segítségével (5%-os szignifikancia szinten) értékeltem.

A teljes lineáris modellben a kölcsönhatástag nem volt szignifikáns, így azt elhagytam, és anélkül futtattam le újra a varianciaanalízist. Ennek eredményét a 6. táblázat tartalmazza.



9.ábra: A három különböző összetételű és hígítású puffer oldat sejtszám értékeinek szórása és átlaga értékei három eltérő hígításban

6.táblázat: Robusztusság-vizsgálat: ANOVA tábla

	Szabadsági fok	Adj SS	Adj MS	F-érték	P-érték
Puffer	2	1,58227E+16	7,91136E+15	1,24	0,310
Hígítás	2	7,76727E+16	3,88364E+16	6,08	0,008

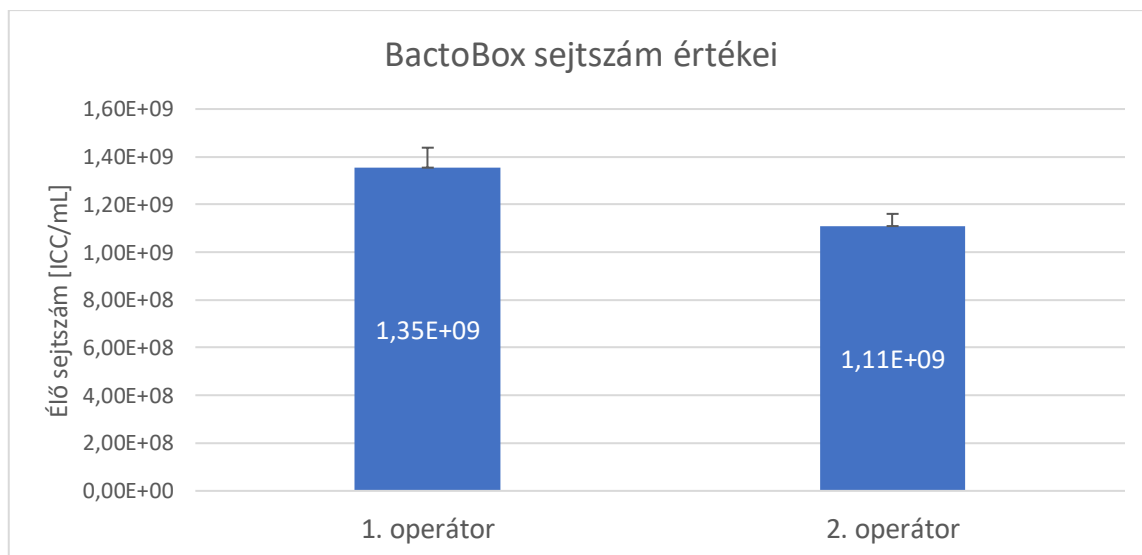
Az ANOVA táblázat alapján az alkalmazott pufferek között nem volt kimutatható szignifikáns különbség ($p=0,310$), azonban a hígítás 5%-os szignifikanciaszinten szignifikáns hatással bír a mért élő sejtszámra ($p=0,008$).

Ennek megfelelően a továbbiakban 3 különböző hígítási léptékből mért élő sejtszám-értékek átlagaként közöltem az eredményeket. A 3 különböző hígítást úgy végeztem, hogy a vizsgált minta várható sejtszáma 1×10^5 ICC/mL és $1,5 \times 10^6$ ICC/mL közötti tartományt lefedje.

5.2.2 PRECIZITÁSI PARAMÉTEREK

5.2.2.1 OPERÁTOROK KÖZÖTTI PONTOSSÁG

Az egyes operátorok/analitikusok által mért eredményeket (10.ábra) ekvivalencia teszttel értékeltem ki (7.táblázat). Az 1.melléklet tartalmazza az operátorok által mért eredményeket.



10.ábra: Három hígításból származó sejtszám értékek átlagai

7.táblázat: Ekvivalencia teszt eredménye

	[-]	[%]
Különbség	-2,45E+08	-18,08
5% CL	-3,17E+08	5,3548335
95% CL	-1,72E+08	-5,3548334
Referencia átlag	1,35E+09	

A táblázat alapján látható, hogy a két operátor közötti különbségre számolt 90%-os konfidencia-intervallum teljes mértékben az előre meghatározott ekvivalencia-tartományon belül van ($\pm 10\%$), ez alapján azt mondhatjuk, hogy a két operátor $\pm 10\%$ -os határon belül ekvivalens. Ez alapján a módszer kezelők közötti pontosságát elfogadhatónak ítélem.

5.2.2.2 VIZSGÁLATON BELÜLI PRECIZITÁS

A műszernek vagy másképp fogalmazva a leolvasásnak tulajdonítható varianciát a relatív sztenderd deviáció értékével fejeztem ki. Az előzőekben bemutatott, operátorok közötti különbséget vizsgálni hivatott kísérlet lehetővé tette azt is, hogy mindkét operátor által mért értékekre meghatározzam a CV értéket. Ezt a 8. táblázatban foglaltam össze.

8.táblázat: Operátorokra meghatározott CV érték

	1. operátor	2. operátor
CV [%]	6,17	4,61
Összesített átlag [ICC/mL]	1,35E+09	1,11E+09

A 9. táblázat adatai alapján kijelenthető, hogy az elfogadási kritériumok teljesültek, vagyis mindkét operátor által mért értékek variancia-együtthatója 10% alatt volt, így a módszer vizsgálaton belüli precizitását elfogadhatónak ítélem.

5.2.2.3 VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI PRECIZITÁS

A teljes mérési módszernek tulajdonítható varianciát szintén a variancia-együtthatóval fejeztem ki. Egy operátor által végzett 6 független élő sejtszám-meghatározás eredménye alapján meghatározott CV értéke 10,59%. Ez várhatóan nagyobb, mint a vizsgálaton belüli precizitás, hiszen a mintaelőkészítéssel (hígítási sorozat előállítás) nagyobb bizonytalanságot viszünk a rendszerbe. Ennek ellenére elmondható, hogy az elfogadási kritérium teljesül ($CV \leq 15\%$), a módszer vizsgálatok közötti precizitása elfogadható.

5.2.3 SPECIFIKUSSÁG

Vizsgálatom célja az volt, hogy meghatározzam a módszer specifikusnak tekinthető-e az élő sejtek számának a mintamátrixból történő meghatározására.

A különböző élő/halott sejtszám arányokat tartalmazó mintákból mért eredményeket a 9. táblázat és a 11. ábrán látható diagram foglalja össze.

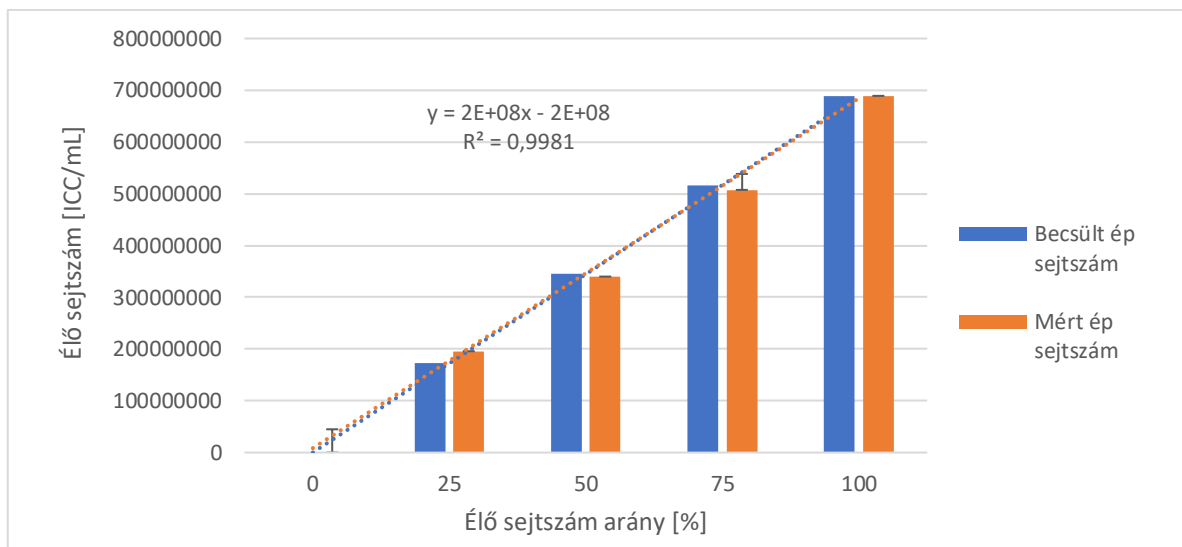
9.táblázat: Specifikusság vizsgálat eredményei

Élő sejtszám arány	Becsült élő sejtszám érték [ICC/mL]	Mért élő sejtszám érték [ICC/mL]	Visszanyerési százalék [%]
0	0	0	n.a.
25	1,72E+08	1,96E+08	113,66
50	3,45E+08	3,40E+08	98,67
75	5,17E+08	5,08E+08	98,19
100	6,89E+08	6,89E+08	n.a.

A becsült- és a mért sejtszám értékek összehasonlításának alapja a visszanyerési százalék, amely 80-120%-on belüli tartományban elfogadható. A 25:75, 50:50, 75:25 élő:holt sejtszám arányban elegyített minták elfogadhatónak bizonyultak (9.táblázat). A 0% élő sejtet tartalmazó minta esetében a mért érték kisebb volt, mint a meghatározási határ így az erre vonatkozó elfogadási feltétel is teljesült. A 2.melléklet szemlélteti minden mérés esetében az élő sejtszám értékeket.

A becsült élő sejtek számát a szuszpenzióban lévő mért élő sejtek számával összevetve ábrázoltam a 11.ábrán. A mért élő sejtszámokat ábrázoltam a hígítási arányok függvényében, majd regressziós

egyenest illeszttem majd az adatokra. Az egyenes determinációs együtthatójának értéke nagyobb volt, mint a vele szemben támasztott minimum követelmény ($0,9981 > 0,9000$).



11.ábra: Regressziós egyenes illesztése a becsült- és a mért adatok oszlopdiagramként ábrázolt értékeire

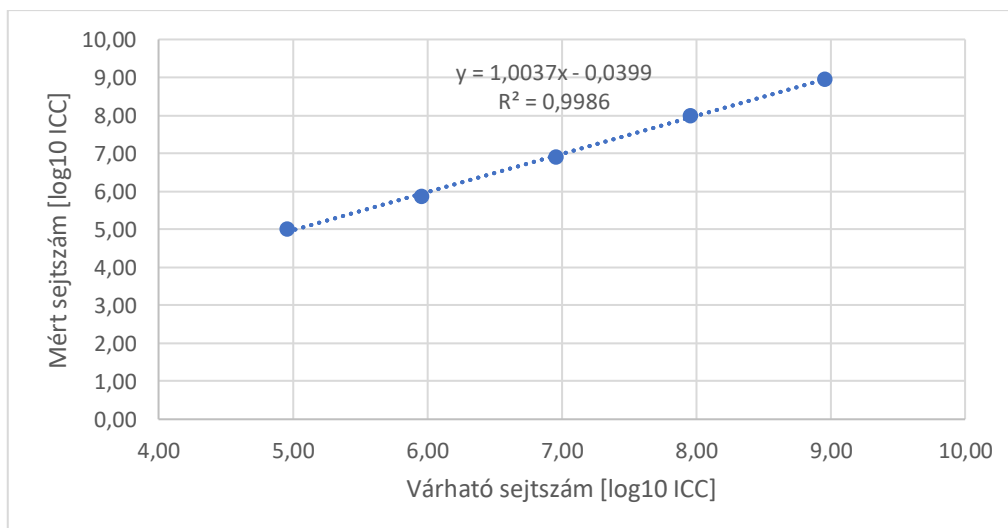
További kritérium volt, hogy a 100%-ban inaktivált minta élő sejtszám értéke a meghatározási határ alá essen, ami szintén teljesült. Összességében kijelenthető, hogy a módszer minden elfogadási kritériumnak eleget tett, tehát a módszer specifikus az élő sejtek számára vonatkozóan a vizsgált mintamátrixból.

5.2.4 LINEARITÁS VIZSGÁLAT

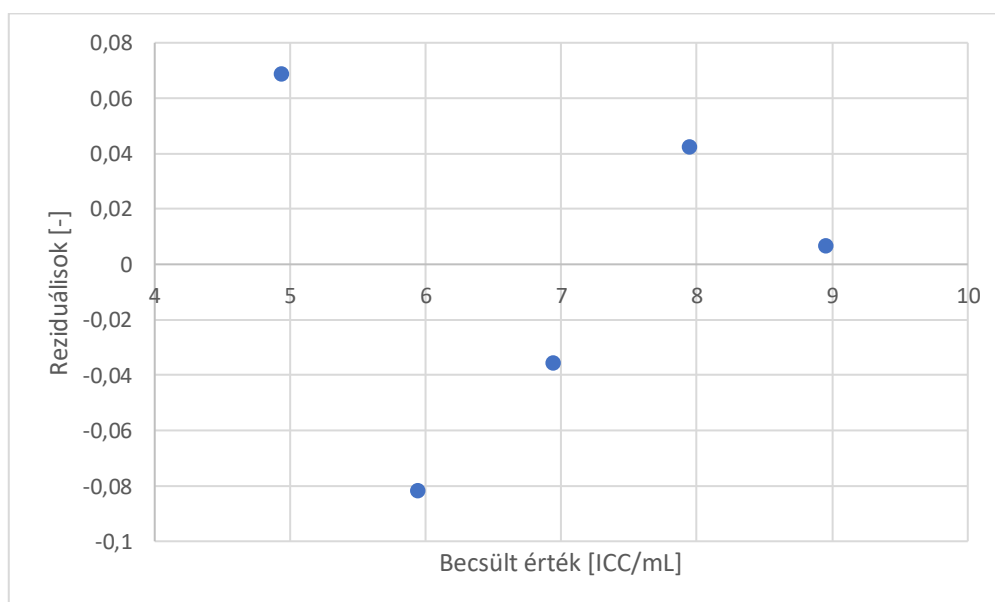
A módszer linearitását tízes léptékű hígítási sorozatból ($0-10^4$ hígítási tartományban) kapott minták elemzésével határoztam meg. A mért, illetve a névleges élő sejtszám értékek közötti lineáris összefüggést vizsgáltam, ennek eredményeit mutatom be az alábbiakban. A 3.mellékletben láthatók a Bac-toBox mérőműszer által mért nyers adatok.

10.táblázat: A lineáris vizsgálat mintaelőkészítése alapján a várható sejtszám- és a hígítás mértéke szerint visszaszámolt három mérési eredményből átlagolt sejtszám értékek

Hígítás	Várható sejtszám [ICC/mL]	Várható sejtszám log10 [ICC/mL]	Mért sejtszám log10 [ICC/mL]	Mért sejtszám [ICC/mL]
0	9,06E+08	8,96	8,96	9,06E+08
10	9,06E+07	7,96	7,99	9,75E+07
100	9,06E+06	6,96	6,91	8,08E+06
1000	9,06E+05	5,96	5,86	7,20E+05
10000	9,06E+04	4,96	5,00	1,01E+05



12.ábra: A regressziós egyenes logaritmizált adatokra illesztve



13.ábra: Regressziós modell hibatagjai

11.táblázat: Regressziós statisztika összesítő

Regressziós statisztika	
R értéke	0,9992
R-négyzet	0,9986
Korrigált r-négyzet	0,9981
Standard hiba	0,0697
Megfigyelések	5

A korrelációs együttható (R) értéke 0,9992, ami teljesíti az erre vonatkozó elfogadási feltételt ($\geq 0,95$), valamint nagyon szoros korrelációra utal. Illetve az R-négyzet is nagyobb, mint 0,900.

A regressziós modell hibatagjait ábrázoló diagram (13.ábra) vizuális vizsgálata alapján elmondható továbbá az is, hogy a hibatagok véletlenszerűen oszlanak meg az illesztett egyenes körül.

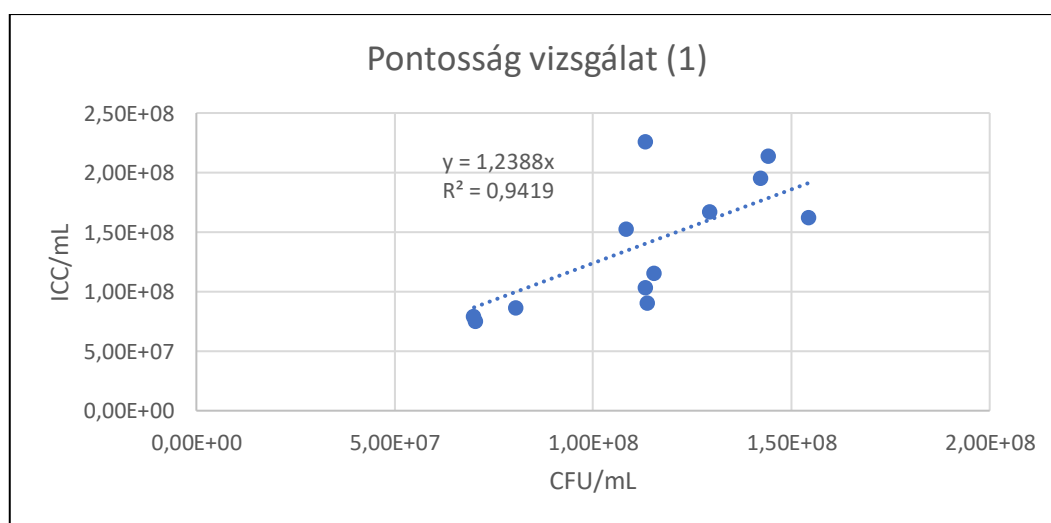
Mivel a linearitásra vonatkozó minden feltétel teljesült, ezért a módszer linearitását elfogadhatónak ítéltm.

5.2.5 PONTOSSÁG

Az anyagok és módszerek fejezetben bemutatottak alapján kétféle megközelítéssel vizsgáltam a módszer pontosságát.

A lineáris regresszió alapuló megközelítésben úgy vizsgáltam a módszer pontosságát, hogy egy egyenest illesztettem a két módszerrel mért értékekre, ebben az esetben a válaszváltozó a BactoBox-szal mért értékek (Y), a magyarázó változó pedig a lemezszámlálással kapott értékek (X) voltak. A két módszer közti egyezés mértékét a regressziós koefficiens adta meg.

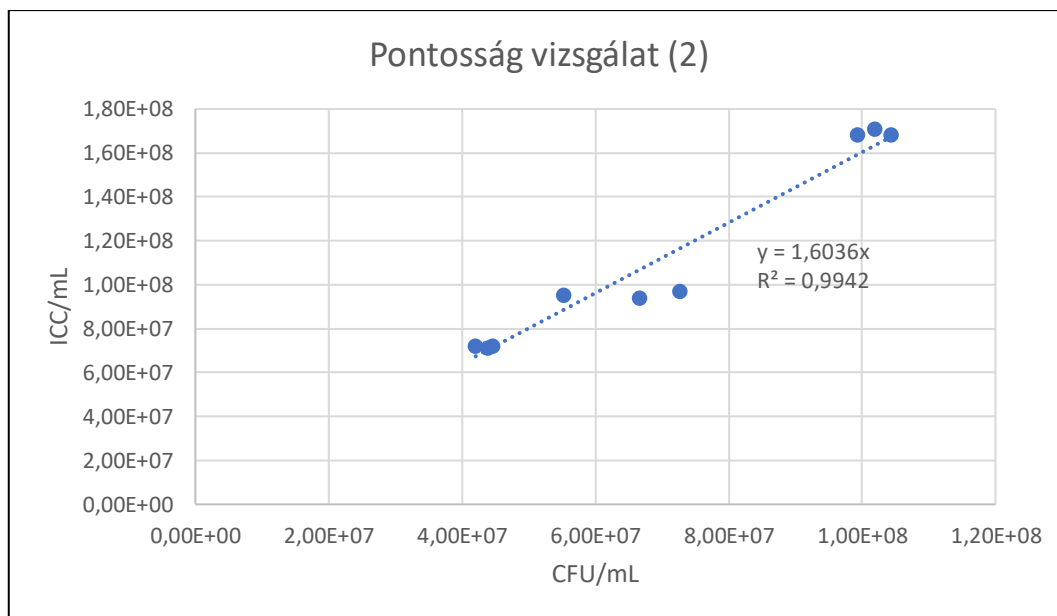
A 14. és 15. ábra szemlélteti a méréseim eredményeit:



14.ábra: Első alkalommal számított lineáris regresszió

Az így kapott regressziós együttható 1,2388 volt, ami éppen az elfogadási határ felső szélére esik ($0,8 \leq \beta \leq 1,2$). Azonban, ahogy a 14.ábrán látható, annak ellenére, hogy az illeszkedésre utaló determinációs együttható elég magas volt (0,9419), a mért értékek nagyon szóródnak az egyenes körül, ezért a kísérletet megismételtem, hogy megbízható következtetéseket tudjak levonni.

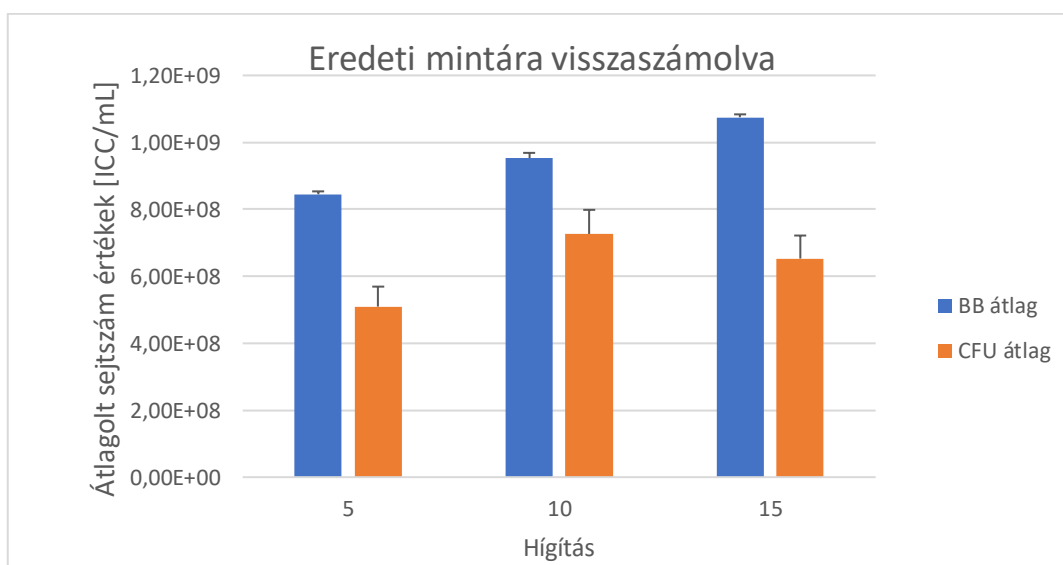
A második mérés során kapott értékre illesztett regressziós egyenes:



15.ábra: Második alkalommal számított lineáris regresszió

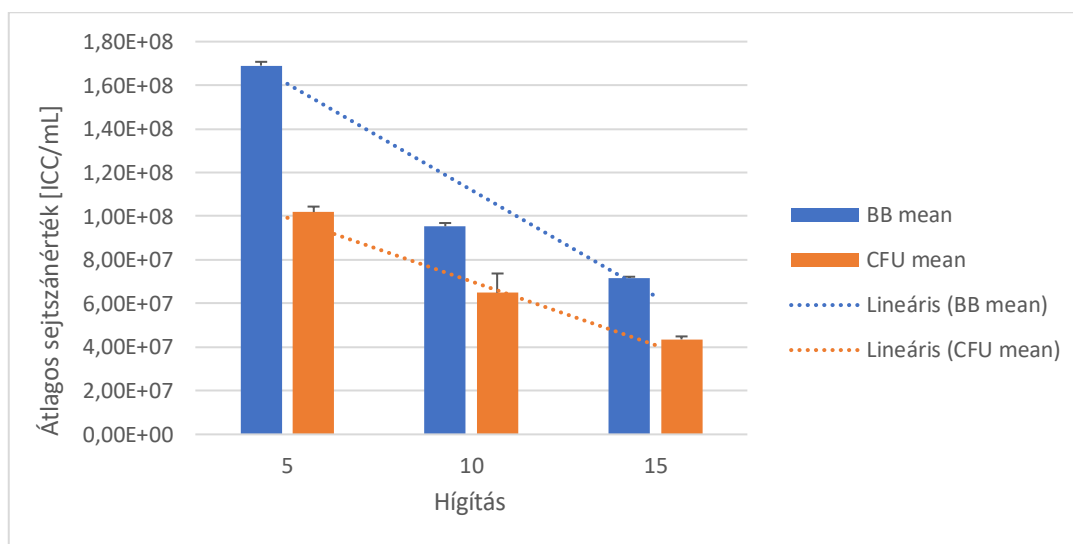
Az egyenes illeszkedésére utaló mérőszám magasabb, mint az előző esetben (0,9942), és szemmel láthatóan is kevésbé szóródnak az egyenes körül a mért értékek, így ezt a modellt megbízhatóbbnak ítéltm következtetések levonása céljából. Az így kapott regressziós együttható (β) értéke 1,6036, ami jóval az előre meghatározott elfogadási határon kívül esik ($0,8 \leq \beta \leq 1,2$).

Az 16.ábrán látható, hogy az eredményeket az eredeti mintára visszaszámolva a BactoBox-szal mért élő sejt számok mindig magasabbak lesznek, mint a lemezszámlálási módszer esetében kapott értékek. Átlagosan a BactoBox-szal meghatározott élő sejt szám-értékek 65%-a a szélesztéssel meghatározott élő sejt szám.



16.ábra: Hígításokat figyelembe véve az eredeti mintára visszaszámolt élő sejt szám értékek

Oszlopdiaagramban ábrázolva az adatokat az (17.ábra) jól megfigyelhető, hogy minél töményebb a szuszpenzió vagyis minél nagyobb az élő sejtszám koncentrációja annál nagyobb lesz az eltérés, vagyis annál jobban távolodnak el egymástól az egyenesek a BactoBox-szal mért értékek és a lemezszámlálási módszerrel mért értékek között.



17.ábra: Oszlopdiaagrammon ábrázolt átlagolt sejtszám értékek

Az ekvivalencia-teszt alapú megközelítésben az eredeti mintára visszaszámolt adatokat felhasználva vizsgáltam a módszer pontosságát. A két módszerrel mért átlagok különbségét vettem, amire egy 90%-os konfidencia intervallumot állítottam fel. Ennek alsó és a felső határait a referencia módszerhez viszonyítva százalékban fejeztem ki, majd azt vizsgáltam meg, hogy az előre meghatározott $\pm 10\%$ ekvivalencia intervallumon belül vannak-e az így kapott értékek.

12.táblázat: TOST ekvivalencia teszt kiértékelésének eredménye

Alkalmak	Módszer	Átlag értékek	Különbség	Különbség [%]	Ekvivalencia intervallum [±%]	Alsó határ	Felső határ	Konfidencia intervallum [±%]
1	CFU	5,65E+08	-5,57E+08	-98,59	10	-6,46E+08	-4,68E+08	15,77
	BB	1,12E+09						
2	CFU	6,30E+08	-3,28E+08	-52,06	10	-4,09E+08	-2,47E+08	12,88
	BB	9,58E+08						

A két adatsor átlagértékei nem ekvivalensek egymással, mivel kívül esik a konfidenciaintervallum az előre meghatározott határon ($\pm 10\%$). A két módszert legfeljebb 20%-os határon belül lehetne ekvivalensnek nevezni, ami azonban már számottevő különbség.

A kapott eredmények alapján a módszer nem tekinthető pontosnak. Bizonyos megkötések mellett, pl. korrekciós faktor alkalmazásával ($\beta \sim 1,6$) azonban átkonvertálhatók egymásba a két módszerrel mért élő sejtszám értékek. Az eltérés oka valószínűleg a BactoBox kapuzásában (*gating*) keresendő. Ennek szoftveres korrekciója, fejlesztése esetén akár 1:1 megfeleltetés is elérhető lehet a két módszer között, azonban ez egyelőre meghaladja a dolgozat kereteit. Ehhez a gyártóval való konzultációra, együttműködésre van szükség, mivel a felhasználók számára szoftveres módosítás nem biztosított. Minden esetre amennyiben erre lehetőség nyílik, úgy akár baktériumtörzs-specifikus kapuzások, módszerek is létrehozhatók lesznek.

A továbbfejlesztés szempontjából további megoldás lehet még pl. a szélesztéses, illetve a lemezöntéses módszerrel kapott sejtszám eredményekkel való összehasonlítás. A lemezöntéses módszernél minden hígítási tagból 1 ml-t mérünk pipettával a Petri-csészébe nem 0,1 ml –t, mint a szélesztésnél, így csökkenthető a mintaelőkészítés során bevitt hiba. A hagyományos telepszámlálási módszerek esetében számolni kell azzal, hogy az élő, de nem tenyészthető sejtek nem mutathatók ki, továbbá, hogy 1 telep 2 vagy több egyedi sejtből is kifejlődhet. Tehát az egyes módszereknek (hagyományos telepszámlálós módszer, BactoBox) olyan sajátosságaik vannak, amelyek nem feltétlen teszik lehetővé az 1:1 megfeleltetést (ebből adódhat a referencia módszerhez képest kapott pontatlansága a BB-nak). Alkalmazás szempontjából sokkal fontosabb figyelembe venni az adott módszer konzisztenciáját. Nagyon nagy előnye a BactoBox-nak a telepszámlálós módszerrel szemben, hogy kisebb szórásokkal tud mérni és kisebb az operátor hatás is.

Abban az esetben pedig, ha egy gyártási technológiát teljes egészében a BactoBox-ra alapozunk (az alapján állítjuk le a fermentációt, formulázunk, stb), nem a lemezsámlálási módszerre, akkor nincs szükség összehasonlításra, így megfeleltetésre.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám célja az volt, hogy egy alternatív megoldást találjak a hagyományos lassú és kevésbé megbízható eredményeket szolgáltató sejtszámlálási módszer helyett. A tenyésztéses lemezszámlálási módszer legfőbb hibája a sejtek életképességi állapotának a nem megfelelő becslése, mivel a nem tenyésztethető, de élő baktériumokat ezzel a módszerrel nem lehet kimutatni és megszámolni. Élő baktériumokat tartalmazó vakcinák esetén kritikus folyamatközi minőségellenőrzési paraméter a tenyészet élő sejtszáma, ezért itt kiemelt jelentősége van a gyors sejtszámlálási módszereknek. Munkám során egy ilyen gyors, innovatív, élő sejtszám-meghatározási módszer alkalmazhatóságát vizsgáltam az analitikai teljesítmény jellemzőkön keresztül.

A teljesítmény jellemzők vizsgálatát egy rövid módszerfejlesztési fázis előzte meg, amelynek során megkerestem a méréshez legalkalmasabb hőmérséklet-tartományt – azt vizsgáltam, hogy a különböző hígító folyadékok fajlagos vezetőképessége hogyan függ a mérési hőmérséklettől. Vizsgáltam továbbá a különböző operátorok hatását a mért adatokra nézve.

Részben a fejlesztési fázishoz tartozik a módszer robusztusságának vizsgálata is, hiszen ennek eredményei alapján alakult ki a véglegesnek tekintett, későbbiekben alkalmazott élő sejtszám-meghatározási módszer. Ennek során különböző hígítópufferek és hígítási szintek hatását vizsgáltam a mérés által szolgáltatott eredményre. A minta megfelelő tartományon belüli hígítása elengedhetetlen a módszer működéséhez. A hígítási arányokat úgy kellett meghatározni, hogy minimum három hígítási tag alapján kapott értékek átlaga adjon egy sejtszám értéket, illetve, hogy a mérésre szánt minták sejtszám értékei a BactoBox működése szempontjából az optimális $1 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$ ICC/ml tartományt fedjék le.

Ezután következett az analitikai teljesítményjellemzők vizsgálatán keresztül a módszer validálása a 13. táblázatban felsorolt teljesítményjellemzők alapján.

A hagyományos módszerrel kapott összehasonlító mérések alapján statisztikailag kimutatható, hogy a BactoBox mérőműszer adatai megbízhatóbb mérési eredményeket szolgáltatnak, kevésbé szóródnak a középérték körül. Azonnali információt kaptam a mérések során a tenyészet élő sejtszámáról. A módszer nem igényelt tenyésztést, így lehetővé vált az életképes, de nem tenyésztethető sejtek számba vétele, amelyek a hagyományos laboratóriumi táptalajon nem tenyésztethetők, vagyis lemezszámlálási módszerrel nem lehet kimutatni ezeket a sejteket, ami magyarázatot ad a BactoBox-szal mért magasabb sejtszám értékekre. A BactoBox képes volt egyenként elemezni és számba venni a

sejteket, míg a tenyésztési módszer esetében a sejtek összetapadhattak és több sejt is kialakíthatott egy telepet, ezzel magyarázható a BactoBox-szal kapott magasabb sejtszám érték.

13.táblázat: A statisztikai paraméterek összegzése

Validálási paraméter	Elfogadási feltétel	Eredmény	Következtetés
Robosztusság I.: Puffer	$p \geq 0,05$	$p = 0,310$	Robusztus
Robosztusság II.: Hígítás	$p \geq 0,05$	$p = 0,008$	Nem robusztus
Vizsgálaton belüli precizitás (operátor)	a. $CV \leq 10\%$ b. TOST-ekvivalencia teszt	a. $CV_{1. \text{ operátor}} = 6,17 \%$ $CV_{2. \text{ operátor}} = 4,61 \%$ b. 10%-os határon belül egyenértékű	Az operátorok egyenértékűek.
Vizsgálatok közötti precizitás	$CV \leq 15\%$	$CV = 10,59 \%$	Precíz
Specifikusság	a. $80\% \leq \text{Recovery} (\%) \leq 120\%$ b. $R^2 \geq 0,9$ c. ICC (100% intakt) <LOQ	a. $R\text{-sq} = 0,9981$ b. ICC (100% inakt) <LOQ c. A visszanyerés: 1) A 25%-os arányban élő minta visszanyerése: 113,66%. 2) Az 50%-os élő arányú minta visszanyerése: 98,67%. 3) A 75%-os élő arányú minta visszanyerése: 98,19%.	Specifikus
Linearitás	$R^2 \geq 0,90$ $R \geq 0,95$ A maradékok véletlen eloszlása.	$R^2 = 0,9986$ $R = 0,999$ Véletlen eloszlás.	Lineáris
Pontosság	a. $0,8 \leq \beta \leq 1,2$ és/vagy b. Az egyenértékűsége $\pm 10\%$ -on belül lehet következtetni.	a. Első alkalom: $\beta = 1,8$ Második alkalom: $\beta = 1,7$ b. Első alkalom: $\pm 15,77 \%$ Második alkalom: $\pm 12,88 \%$	Pontatlan

A referenciamódszerhez viszonyítva nem tekinthető pontosnak, de a kapott faktor értékkel korrigálhatók az eredmények.

A gyógyszeriparban és más területeken a baktériumok koncentrációjának gyors és pontos mennyiségi meghatározására irányuló igény kereskedelmi szempontból még mindig kielégítetlen.

Ez a munka megmutatta, hogy az IFC alkalmas lehet ennek az igénynek a kielégítésére, mivel a technológia lehetőséget ad arra, hogy vezetőképességből következtetve, indirekten, gyorsan és hatékonyan számba vegyünk az élő sejteket.

7 IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Ansari, N., Yazdian-Robati, R., Shahdordizadeh, M., Wang, Z., & Ghazvini, K. (2017). *Aptasensors for quantitative detection of Salmonella Typhimurium*. Analytical Biochemistry. 533, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.008>
- Arega, S. M., Knobel, D. L., Toka, F. N., & Conan Anne. (2022). Non-specific effects of veterinary vaccines: a systematic review. *Vaccine*, 40(11), 1655–1664. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.11.034>
- Ariel, I. (2007). *A baromfi Salmonella Enteritidis elleni korai védelmet szolgáló törzsek előállítása virulencia plazmidra és flagellin rendszerre irányuló mutagenézissel* (Doktori értekezés tézisei). Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest.
- Berstelten, V. C. (2021). *Screening of Bacteria using Impedance Flow Cytometry* (Industrial PhD Thesis). Technical University of Denmark.
- Bolla, M., Krámli, A., & Nagy-György, J. (2013). *Többváltozós statisztikai módszerek*. Szegedi Tudományegyetem, Szeged.
- Borsodi, A., Makk, J., Romsics, C., Felföldi, T., Jáger, K., Vajna, B., Ács, É., Palatinszky, M., & Márialigeti, K. (2018). *Klasszikus és molekuláris laboratóriumi gyakorlatok* (Elektronikus jegyzet). Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
- D'aoust, J.-Y. (1994). *Salmonella and the international food trade*. International Journal of Food Microbiology, 24, 11–31.
- Edelman, R. (1980). *Vaccine Adjuvants*. Reviews of Infectious Diseases, 2(3) 370-383. <https://doi.org/10.1093/clinids/2.3.370>
- Erdősi, O. (2014). *Gyors mikrobiológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása élelmiszer-és környezet-higiéniai vizsgálatokban* (PhD értekezés). Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest.
- Griffith, R. W., Carlson, S. A., & Krul, A. C. (2019). *Salmonellosis* Ch. 59 in Diseases of Swine, Eleventh Edition (Eds.: J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang) <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch59>
- Hoelzer, K., Switt, M. I. A., & Wiedmann, M. (2011). *Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis*. Veterinary Research 42(1) 34-61. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>
- Ittész, A. (2020a). *Kétmintás paraméteres próbák*. Retrieved from <http://2012books.lardbucket.org/books/beginning-statistics>
- Ittész, A. (2020b). *Spearman's rank correlation* (Egyetemi tananyag belső használatra). Szent István Egyetem, Budapest. Retrieved from https://en.wikipedia.org/wiki/Spearman%27s_rank_correlation_coefficient
- Kálmán-Szekeres, Z. (2011). *Molekuláris adjuvánsok, azaz az immunválasz szabályozása rekombináns egyláncú ellenanyagokkal történő antigénirányítással* (Immunológiai Program). ELTE TTK Biológia Doktori Iskola, Budapest.
- Kriszt, É., Varga, E., Kenyeres, E. (1997). *Általános statisztika II*. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 299 p.
- Mahendra, P., Bethlehem Mesfen, T., Fikru, G., Gezahagn, A., & Venkataramana, K. (2020). *Animals and Food of Animal Origin as a Potential Source of Salmonellosis: A Review of the Epidemiology, Laboratory Diagnosis, Economic Impact and Public Health Significance*. American Journal of Microbiological Research, 8(2), 48–56. Retrieved from <http://pubs.sciepub.com/ajmr/8/2/2>

- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). *Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 45(12), 1102–1111. doi:10.1590/s0100-879x2012007500142
- Németh, Á. (2011). *Ipari mikrobiológia*. Budapesti Műszaki Egyetem, Budapest. Retrieved from www.tankonyvtar.hu
- Newsom, J. T. (2021). *Multiple Regression and Multivariate Quantitative Methods, ANOVA and Regression Equivalence*. Tananyag: Department of Psychology, Portland State University
<https://web.pdx.edu/~newsomj/mvclass/>
- Pállinger, É., Buzás, E., Falus, A., Nagy, G., Holub, M. C., Tóth, S., Köhidai, L., & Pál, Z. (2012). *Immunológiai szemináriumok*. Budapest: Semmelweis Egyetem.
- Popoff, M.-Y., Bockemühl, J., & Brenner, F. W. (2000). *Salmonella*. Res Microbiol. 151(1):63-5. doi: 10.1016/s0923-2508(00)00126-1. Supplement 1998 (no. 42) 43 to the Kauffmann-White scheme
- Rohonczy, K. (2014). *Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló gyors módszerek összehasonlító vizsgálata* (Doktori értekezés tézise). Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Budapest.
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention*. Travel Medicine and Infectious Disease. 9(6), 263–277. doi: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
- Szakmár, K. (2009). *Redox-potenciál mérésen alapuló gyors mikrobiológiai módszer validálása és ipari alkalmazhatóságának vizsgálata* (PhD értekezés). Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Budapest.
- Tombácz, K. (2015). *Sertés circovírus vakcinák fejlesztése* (PhD értekezés). Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest.
- Tóth, R., Farsang, A., & Zádori, Z. (2016). *Az állatorvosi vakcinák adjuvánsainak hatásmechanizmusai* Mechanisms of action of veterinary vaccines' adjuvants. Magyar Állatorvosok Lapja, 138 (1), 31-46
- Varga J., Rusvai M., Fodor L. (2018). *A háziállatok fertőző betegségei*. Magyar Állatorvosi Kamara, Budapest.

8 INTERNETES FORRÁSOK

- Internet 1. <http://www2.sci.u-szeged.hu/inorg/Segedanyag%20-%20Alapfogalmak.pdf>
- Internet 2. <https://www.muszeroldal.hu/measurenotes/validalas.pdf>
- Internet 3. <http://www.opulus.hu/microcontamination/endotoxin/effects/effects.asp>
- Internet 4. <https://nanocollect.com/blog/why-flow-cytometry-in-immunology-is-important/>

9 MELLÉKLETEK

1.melléklet: Az operátorok által mért eredmények

Operátorok	Hígítások	Ismétlés száma	Mért élő sejtszám értékek [ICC/mL]	Becsült élő sejtszám értékek átlagai [ICC/mL]	Összesített átlag [ICC/mL]	CV [%]
1.	750	1	1,67E+06	1,34E+09	1,35E+09	6,17
	2000	1	5,80E+05			
	10000	1	1,60E+05			
	750	2	1,69E+06	1,30E+09		
	2000	2	5,60E+05			
	10000	2	1,50E+05			
	750	3	1,57E+06	1,38E+09		
	2000	3	6,30E+05			
	10000	3	1,70E+05			
	750	4	1,68E+06	1,43E+09		
	2000	4	7,20E+05			
	10000	4	1,60E+05			
	750	5	1,64E+06	1,45E+09		
	2000	5	6,60E+05			
	10000	5	1,80E+05			
	750	6	1,67E+06	1,23E+09		
	2000	6	4,20E+05			
	10000	6	1,60E+05			
2.	750	1	1,44E+06	1,02E+09	1,11E+09	4,61
	2000	1	6,30E+05			
	10000	1	7,30E+04			
	750	2	1,66E+06	1,12E+09		
	2000	2	6,50E+05			
	10000	2	8,00E+04			
	750	3	1,62E+06	1,18E+09		
	2000	3	6,10E+05			
	10000	3	1,10E+05			
	750	4	1,67E+06	1,09E+09		
	2000	4	5,30E+05			
	10000	4	9,60E+04			
	750	5	1,68E+06	1,13E+09		
	2000	5	6,00E+05			
	10000	5	9,30E+04			
	750	6	1,68E+06	1,12E+09		
	2000	6	6,50E+05			
	10000	6	8,00E+04			

2.melléklet: Specifikusság mintaelőkészítése alapján kapott sejtszám értékek

Sejtek	Hígítás	Mért élő sejtszám [ICC/mL]	Becsült élő sejtszám [ICC/mL]	Átlag	SD	CV [%]
100% élő	750	8,50E+05	6,38E+08	6,89E+08	4,50E+07	6,53
	2000	3,60E+05	7,20E+08			
	10000	7,10E+04	7,10E+08			
100% előlt	750	1,30E+04	9,75E+06			
	2000	<5000				
	10000	<5000				
25% élő + 75% előlt	750	2,50E+05	1,88E+08	1,96E+08	3,09E+07	15,76
	2000	8,50E+04	1,70E+08			
	10000	2,30E+04	2,30E+08			
50% élő + 50% előlt	750	4,40E+05	3,30E+08	3,40E+08	1,73E+07	5,09
	2000	1,80E+05	3,60E+08			
	10000	3,30E+04	3,30E+08			
75% élő + 25% előlt	750	7,10E+05	5,33E+08	5,08E+08	2,63E+07	5,19
	2000	2,40E+05	4,80E+08			
	10000	5,10E+04	5,10E+08			

3.melléklet: Linearitás vizsgálat mintaelőkészítésének sejtszám értékei

Előhígítás	Hígítás	Mért ICC/mL	Becsült ICC/mL	Átlag
0	750	8,50E+05	6,38E+08	9,06E+08
	2000	4,90E+05	9,80E+08	
	10000	1,10E+05	1,10E+09	
10	75	1,18E+06	8,85E+07	9,75E+07
	200	5,20E+05	1,04E+08	
	1000	1,00E+05	1,00E+08	
100	8	1,07E+06	8,03E+06	8,08E+06
	20	4,10E+05	8,20E+06	
	100	8,00E+04	8,00E+06	
1000	-	8,30E+05	8,30E+05	5,40E+05
	-	7,30E+05	7,30E+05	
	10	6,00E+04	6,00E+04	
10000	-	9,00E+04	9,00E+04	1,01E+05
	-	9,30E+04	9,30E+04	
	-	1,20E+05	1,20E+05	