



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105899933 B

(45)授权公告日 2020.03.03

(21)申请号 201480071692.7

(22)申请日 2014.10.28

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105899933 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(30)优先权数据  
61/896877 2013.10.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.06.29

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/062624 2014.10.28

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/066006 EN 2015.05.07

(73)专利权人 艾德克斯实验室公司  
地址 美国缅因州

(72)发明人 J.哈蒙德 J.拉塞尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 彭昶

(51)Int.Cl.  
G01N 15/02(2006.01)

(56)对比文件  
US 2009185734 A1,2009.07.23,  
WO 2011072698 A1,2011.06.23,  
CN 102301269 A,2011.12.28,  
HoJung Cho, et al..Self-organization  
in high-density bacterial colonies:  
Efficient crowd control.《PLOS BIOLOGY》  
.2007,第5卷(第11期),2614-2623.  
Hugo Wioland,et al.Confinement  
Stabilizes a Bacterial Suspension into a  
Spiral Vortex.《PHYSICAL REVIEW LETTERS》  
.2013,第110卷(第26期),268102(5).

审查员 陶颖

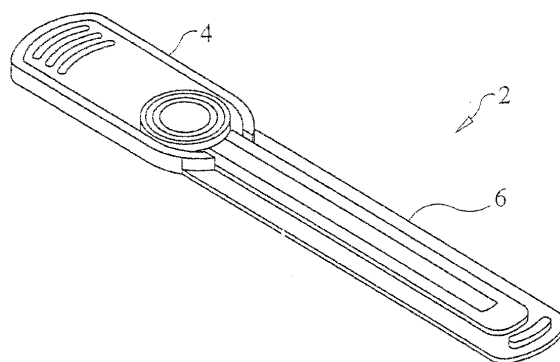
权利要求书2页 说明书17页 附图20页

(54)发明名称

用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法

(57)摘要

本文公开了一种用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法,其包括在经过一段时间以允许样品中的非细菌沉降至容器底部之后,以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取穿过容纳一定体积的液体样品的容器的光学切片的步骤。由于细菌在液体样品中自动排列,形成格子样网格模式,穿过自动排列的细菌的体积的光学切片可用于测量位于该切片中的细菌的数量。用于容纳液体样品的容器具有帮助分离非细菌与细菌的特定结构。



1. 一种用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,所述方法包括以下连续步骤:

在经过预定的时间以允许液体样品中的细菌自动排列成均匀分布之后,在所述液体样品的体积中以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取至少一个穿过所述体积的光学切片;

以及下列A-C的选项之一:

A: 计数所述至少一个光学切片中存在的细菌的数目;

计算所述液体样品的体积可分成的光学切片的数目,从而确定可能的光学切片的总数;

将所述至少一个光学切片中存在的细菌的数目乘以可能的光学切片的总数,从而确定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值;或

B: 获取多个穿过所述体积的光学切片;

计数所述多个光学切片的每一光学切片中存在的细菌的数目;

通过所述多个光学切片中存在的细菌的总数除以穿过所述液体样品的体积获取的光学切片的数目计算存在的细菌数目的平均值,从而确定所述多个光学切片的光学切片中存在的细菌的平均数目;

计算液体样品的体积可分成的光学切片的数目,从而确定可能的光学切片的总数;

将所述多个光学切片的光学切片中存在的细菌的平均数目乘以可能的光学切片的总数,从而确定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值;或

C: 确定所述至少一个光学切片中存在的细菌之间的平均间隔,从而确定平均细菌间隔;

计算所述液体样品体积所占据的三维区域,从而确定三维体积区域;

将所述三维体积区域除以细菌之间的平均间隔,从而确定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值;以及

将选项A、B或C用于基于液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值确定液体样品中的细菌浓度。

2. 如权利要求1所定义的用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中在其包括选项A的步骤时,所述允许液体样品中的细菌自动排列的预定时间为3分钟-90分钟。

3. 如权利要求1所定义的用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中在其包括选项A的步骤时,所述允许液体样品中的细菌自动排列的预定时间为3分钟-10分钟。

4. 如权利要求1所定义用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中在其包括选项A的步骤时,所述穿过液体样品的体积获取的至少一个光学切片具有相对于穿过该体积的垂直平面零度至九十度的焦平面角度。

5. 如权利要求1所定义的用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中在其包括选项A的步骤时,所述穿过液体样品的体积获取的至少一个光学切片具有相对于穿过该体积的垂直平面约0度的焦平面角度。

6. 如权利要求1所定义的用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中在其包括选项A的步骤时,所述穿过液体样品的体积获取的至少一个光学切片具有相对于穿过该体积的垂直平面约90度的焦平面角度。

7. 如权利要求6所定义的用于在液体样品中检测细菌和确定其浓度的方法,其中所述光学切片具有液体样品体积的底部上方约100微米、约200微米、约400微米、约600微米、约800微米、约1,000微米和约1,200微米中的至少一个的焦平面深度。

8. 用于检测液体样品中的细菌的方法,所述方法包括以下步骤:

在经过预定的时间以允许细菌若在所述液体样品中存在的话自动排列成均匀分布之后,用具有照相机的流体成像系统在所述液体样品的体积中以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取至少一个穿过所述体积的光学切片;和

通过在细菌已自动排列后计算细菌之间是否存在三维等距间隔,确定液体样品中是否存在细菌。

## 用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请与2013年10月29日提交的标题为“用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法和装置”的美国临时申请序列号61/896,877有关,所述临时申请的公开内容通过引用结合到本文中并且因此对其要求优先权。

[0003] 发明背景

[0004] 发明领域。

[0005] 本发明一般地涉及流体样品中颗粒的检测和定量,并且更具体地涉及用于在液体样品,特别地,尿样品中检测细菌和测定其浓度的方法和装置。

[0006] 现有技术说明

[0007] 许多方法常规用于检测和评估尿样品中的细菌。例如,存在用于评估尿沉积物的自动分析仪,其主要利用液体样品流过流动池并使用流式细胞术或流动颗粒的图像分析。还存在不同类型的可实施的流体图像捕获方法,包括美国专利号8,789,181 (Olesen等人)和美国专利申请出版号2012/0244519 (Olesen等人)中公开的光学切片方法。

[0008] 或者,另一种用于检测和评估尿样品中的细菌的常规方法涉及由医疗技术人员使用亮视野显微术进行的手动观察。更具体地,该用于尿显微术的标准方法包括在离心机中旋转液体样品并丢弃上清液,仅留下沉积物团。然后将此团重悬并在显微镜载玻片上盖玻片下使用显微镜评估。用此方法,流体深度非常浅。对于具有常规22 x 22毫米盖玻片的30微升等分试样,深度将为大约60微米,间隔被限制在比更深的流体通道所提供的三维体积更二维的空间。当然,这样的方法为耗时的,对医疗技术人员而言冗长乏味,并且由于细菌的小尺寸和亮视野显微术的局限性常常在定量样品中存在的细菌中导致错误结果。

[0009] 使用成像技术的尿沉积物分析必须在小的非细菌碎片存在下检测尿样品中的细菌。该需求带来挑战,这是因为细菌大约1微米大,接近空气-耦合亮视野显微成像技术 (air-coupled bright field microscopic imaging technique) 的检测极限。在该限制下,可以看到细菌,但不能测定几何学性质,因为由于其尺寸每个细菌可能仅由单个像素代表。该限制使得难以测定细菌与小碎片 (非-细菌) 颗粒之间的差异。该困难也存在于标准亮视野显微术中,其中对于技术人员而言可能难以鉴定特定颗粒是否为细菌,即使用400X放大率。存在其它使用的技术,包括评估在流体中的位置和颗粒尺寸的一致性,以及指示细菌的集落形成。如果细菌的存在情况待证实,那么使用替代的技术例如在亮视野显微术下评估的干、染色的载玻片或定量培养证实细菌的存在情况。

[0010] 上述用常规技术的困难要求在充满碎片的尿环境中更可靠的细菌检测技术。

[0011] 本发明的目标和概述

[0012] 本发明的一个目标为提供评估批量 (bulk) 流体中的细菌的方法。

[0013] 本发明的另一个目标为提供使用细菌的特性作为区分细菌与非-细菌的手段的方法。

[0014] 本发明的又一个目标为提供一种高灵敏度和选择性的用于检测尿介质中的细菌的方法。

[0015] 本发明的进一步的目标为提供测量细菌之间的平均间隔代替尝试计数细菌以估计细菌浓度的方法。

[0016] 本发明的又进一步的目标为提供分离尿样品中的细菌与小碎片颗粒以便帮助测定尿样品中的细菌浓度的可消耗装置。

[0017] 根据本发明的一种形式,用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法包括在过去预定的一段时间以允许样品中的非细菌碎片沉降至容器底部后,以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取一个或多个穿过包含一定体积的液体样品的优选可消耗的(即,可丢弃的)容器的光学切片的步骤。已经发现,过去预定的一段时间后,细菌在液体样品中自动排列,形成基本上遍及大部分液体样品(除了,在一些情况下,在容纳液体样品的可消耗容器表面附近的非细菌地带(zone))的三维均匀间隔的格子样网格模式。因此,穿过自动排列的细菌的体积的光学切片可用于测量位于该切片中的细菌的数量。通过了解容器所容纳液体样品的总体积,可从所测量的位于光学切片中的细菌计算至少所包含体积内的总细菌的近似值。

[0018] 为了帮助实施本发明的方法,本文公开了用于容纳液体样品的可消耗的容器,其特定结构帮助分离非细菌“碎片”与细菌。在一种形式中,所述可消耗容器包括与未凹陷的底部部分毗邻的凹陷底部部分。非细菌碎片会从液体样品沉降入凹陷的底部部分。流体成像装置的光学系统的焦平面设置为接近或处于容器的未凹陷底部部分的水平,以便仅检测到未沉降的细菌。

[0019] 在本发明的另一种形式中,所述容纳液体样品的可消耗容器界定了一个相对长的具有一个或多个从容器底部向上延伸并部分进入借此容纳的液体样品的体积的周期性地间隔开的凸出物,或“减速路障”的通道。凸出物导致仅流体深度高处的那些颗粒,例如自动排列的细菌继续沿通道向下流动。毗邻突出物之间的区域提供特定密度范围的颗粒会积累的询问区(areas for interrogation)。

[0020] 本发明的这些和其它目标、特征和优点会从下列对其说明性实施方案的详细描述显而易见,所述详细描述应结合附图阅读。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A和1B为不包含其它细菌的尿样品中的(图1A)和在尿样品中存在其它细菌时的(图1B)细菌的自由体受力图(free body diagrams)(图示说明(pictorial illustrations)),其用以帮助促进对与每一细菌相关的力和这些力如何与相邻细菌的那些相互作用以及什么(which)引起细菌自动排列并保持悬浮在液体样品中的理解。

[0023] 图2为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的可消耗容器的第一个实施方案的简化的横截面视图。

[0024] 图3为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的可消耗容器的第二个实施方案的简化的横截面视图。

[0025] 图4为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的可消耗容器的第三个实施方案的简化的横截面视图。

[0026] 图5为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的顶部开放微量滴定板形式的可消耗容器的第四个实施方案的简化的横截面视图。

[0027] 图6为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的消耗容器的第五个实施方案的简化的顶视图,所述容器包括多个流动通道以促进通过其的液体样品的毛细管流。

[0028] 图7为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的消耗容器的第六个实施方案的简化的横截面视图。

[0029] 图8为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的消耗容器的第七个实施方案的简化的横截面视图。

[0030] 图9为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的消耗容器的第八个实施方案的简化的横截面视图。

[0031] 图10A和10B分别为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的消耗容器的第九个实施方案的简化的顶视图和沿图10A的线10B-10B获得的横截面视图,所述容器具有在容器底部形成的多个质量保证形状。

[0032] 图11A和11B为尿样品中聚合物底物与相关细菌的自由体受力图(图示说明),以及与每一(with each)相关的力。

[0033] 图12为自动排列状态的细菌的二维模型的顶视图。

[0034] 图13A为不完全的细菌完全填充格子结构时自动排列状态的细菌的二维模型的顶视图。

[0035] 图13B为细菌浓度比图13A中所示增加时自动排列状态的细菌的二维模型的顶视图。

[0036] 图14为自动排列状态的细菌的三维模型的侧视图。

[0037] 图15为倒置亮视野显微术摄影图像,其显示在流体体积中包含多种尺寸的脂类而无细菌的代表性样品。

[0038] 图16为倒置亮视野显微术摄影图像,其显示在流体体积中包含碎片而无细菌的代表性样品。

[0039] 图17A为理论直方图(theoretical histogram)模型叠加,其显示当容器刚刚用尿样品填充时样品容器中存在的四种颗粒类型(细菌、有形成分、脂类和碎片)中的每一种,纵坐标代表样品容器的深度,以微米( $\mu\text{m}$ )计,横坐标代表四种颗粒的细胞计数。

[0040] 图17B为理论直方图模型叠加,其显示容器用尿样品填充后经过一些时间并且一些颗粒沉降发生后容器中存在的四种颗粒类型(细菌、有形成分、脂类和碎片)的每一,纵坐标代表样品容器的深度,以微米( $\mu\text{m}$ )计,横坐标代表四种颗粒的细胞计数。

[0041] 图18A为在图像阈值化(thresholded)之前流体体积中细菌的亮视野显微术原始图像。

[0042] 图18B为图像阈值化之后的图18A中所示图像,用于根据本发明的物体计数分析。

[0043] 图19A为与图18B中所示相似的用于根据本发明测定像素间隔的阈值化图像的另一个实例。

[0044] 图19B为图19A中所示阈值化图像的放大的部分,其具有指示与最近邻居的间隔的后期处理的线。

[0045] 图20A为尿样品(对于较亮物体)的摄影图像及其相关的直方图,频率作为纵坐标并且灰度值作为横坐标,说明了作为量度以根据本发明方法测定遍及流体体积的细菌分布

的偏斜度。

[0046] 图20B为尿样品(对于较暗物体)的另一个摄影图像及其相关的直方图,频率作为纵坐标并且灰度值作为横坐标,说明了作为量度以根据本发明方法测定遍及流体体积的细菌分布的偏斜度。

[0047] 图21为理论直方图模型叠加,其与图17A和17B中所示的相似,显示在容器刚刚用尿样品填充(参见图17A)和所述过去的时间(参见图17B)之前之间的时间时样品容器中存在的四种颗粒类型(细菌、有形成分、脂类和碎片)的每一,并且说明了其中颗粒分离开始但不完全,纵坐标代表样品容器的深度,以微米( $\mu\text{m}$ )计,横坐标代表四种颗粒的细胞计数。

[0048] 图22A为在容纳尿样品的容器中的三个深度(200、400和600微米)的每一处进行的具有本发明像素间隔逻辑的用于细菌(杆菌)滴定的校准曲线的图,其中纵坐标代表像素间隔平均值,横坐标代表样品中的细菌浓度。

[0049] 图22B为在容纳尿样品的容器中的三个深度(200、400和600微米)的每一处进行的具有本发明像素间隔逻辑的用于细菌(球菌)滴定的校准曲线的图,其中纵坐标代表像素间隔的平均偏差,横坐标代表样品中的细菌浓度。

[0050] 图23A为说明对于具有无定形碎片掺入(spiked with)细菌中的细菌浓度用于区分尿样品中的细菌与非-细菌的本发明四种算法方法的整合的图,其中纵坐标代表响应并且横坐标代表物体计数平均值、密度平均值、偏斜度中位数和像素间隔中位数。

[0051] 图23B为说明对于具有脂类掺入细菌中的细菌浓度用于区分尿样品中的细菌与非-细菌的本发明四种算法方法的整合的图,其中纵坐标代表响应并且横坐标代表物体计数平均值、密度平均值、偏斜度中位数和像素间隔中位数。

[0052] 图24为根据本发明形成的帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的可消耗容器的第十个实施方案的顶透视图。

[0053] 图25为根据本发明形成的并且在图24中示出的可消耗容器的第十个实施方案的顶平面图。

[0054] 图26为根据本发明形成的并且在图24中示出的可消耗容器的第十个实施方案的侧视图。

[0055] 图27为根据本发明形成的并且在图24中示出的可消耗容器的第十个实施方案的底平面图。

[0056] 图28为图27中用参考字母A标记的虚线圆内所示的本发明可消耗容器的第十个实施方案的放大的底平面图。

[0057] 优选实施方案的详述

[0058] 通过实验,发现细菌在液体样品中显示可用于区分细菌与非细菌“碎片”的一些特性。具体地,关于细菌做出了两个观察。一个涉及细菌在流体样品的体积中自动排列的能力,意指细菌形成遍及大部分流体样品的三维均匀间隔的格子样网格模式。另外,在其它颗粒,例如大颗粒,包括红血细胞、白血细胞、晶体和其它小碎片,沉降于容纳液体样品的容器的底部时,细菌倾向于保持悬浮在大部分流体样品中。通过进一步的实验和支持理论,认为前面所提及的为细菌和非细菌的可靠和可重现的特性并且可用作测定液体样品中是否存在细菌和测量样品中的细菌浓度的重要因素。

[0059] 通过实验观察到的一个额外的现象为自动排列的细菌一般还位于容纳液体样品,

例如尿样品的可消耗容器表面附近的“无细菌地带”之外。据悉一些细菌,可能是由于斥力,倾向于“厌恶”表面并且特别地,聚合物表面。当测定液体样品中细菌的存在情况和浓度时也可考虑该因素。

[0060] 更特别地,发现细菌一般显示均匀的颗粒尺寸和遍及液体样品,例如尿样品的均匀分布。该观察与尿样品中可能存在的倾向于聚集在一起并且具有不规则形状的其他小碎片颗粒相反。通过使用显微成像方法,例如前述Ollesen等人发表的美国申请(美国专利申请出版号2011/0261164,其公开内容通过引用结合到本文中)中所公开的那些,发现尿样品中的细菌不仅在焦平面上,还在流体样品的体积或大部分中均匀分布。

[0061] 预定的一段时间之后,例如约3分钟-约90分钟,优选约3分钟-约10分钟,经测定细菌与沉降成分,例如红血细胞、白血细胞和晶体分离,并且在尿样品的大部分体积中保持悬浮。这样的实验中使用的流体成像装置的照相机的焦平面设置为在流体的体积中并且不在可消耗容器的底部,例如距容器底部100微米。来自在尿样品上进行的光学切片的视觉信息提供细菌保留在流体体积内的溶液中和,此外,细菌遍及大部分尿样品自动排列,除了容器的底部和侧表面附近的视觉确认。当容器由聚合物材料制成时该现象尤其存在。大多数非细菌颗粒似乎以约100微米/分钟的下落速度沉降。

[0062] 这些为可用来以可靠和可重现的方式分离细菌与非细菌以及用于检测和评估液体样品中的细菌和测定其浓度的关键区分因素。更具体地,这两种现象在尿样品中细菌的检测和定量中将具有不同的暗示。细菌的自动排列提供了可靠地检测细菌的存在情况的方法,而非细菌地带提供了分离一种形式的细菌与另一种,例如杆状细菌,或“杆菌”,例如,芽孢杆菌属,与球形细菌,或球菌,例如,链球菌属和葡萄球菌属的方法。通过实验,发现不仅葡萄球菌属细菌,而且变形杆菌属、克雷伯氏菌属、肠球菌属、肠杆菌属和大肠杆菌(*E. coli*)形式的细菌不但在成像照相机的焦平面内,还在遍及大部分尿样品内均匀分布。

[0063] 自动排列为本文用于描述细菌在尿样品的三维体积中的物理分布的术语。细菌(杆菌和球菌)具有在流体中均匀分布的天然倾向。运动性似乎不是此种分离的驱动力;然而,似乎存在引起细菌自动排列和维持其在尿样品体积中的定位的其它力,甚至在存在重力的情况下(对于这些颗粒,由于重力引起的力将为基于图1A中所列方程的浮力的大约两倍并且在 $10^{-15}$ 牛顿的数量级)。

[0064] 更具体地,图1A和1B说明了尿样品中细菌的自由体受力图并且代表格子结构的一部分(代表通常所见到的细菌之间一般间隔约10-约60微米的均匀分布)。为了系统维持平衡,向上和向下的力必需匹配,导致净力零,然后细菌将维持稳定、均匀的格子样结构。这样的格子样结构常常倾向于最小能量的状态,并且细菌将倾向于填充由图1B中所示模型界定的最小格子结构中的所有位点。在图1B中,较浅的箭头代表重力和浮力,较深的箭头代表 $\zeta$ 电位力。因此,并且如图1B中所示,样品中的若干细菌会具有相互作用,引起自动排列并且将抑制沉降。换言之,相等和相反的力会维持将自动排列而不沉降的静态结构。供参考,*E. coli*细菌每一会具有约 $2.9\text{--}9.5 \times 10^{-13}$ 克的质量,导致约 $3\text{--}9 \times 10^{-15}$ 牛顿的重力。

[0065] 如附图的图1A所说明的,存在若干与每一细菌相关的力,并且这些力与导致系统维持均匀平衡的每一相邻细菌的力相互作用。更具体地, $x$ -方向的 $\zeta$ 电位力( $F_{zx}$ )与细菌相关; $y$ -方向的 $\zeta$ 电位力( $F_{zy}$ )也作用在细菌上;作用于细菌的浮力( $F_b$ )经测定等于流体的密度乘以体积乘以 $g$ (重力(gravity));作用于细菌的重力( $F_g$ )等于细菌的质量乘以 $g$ (重

力);电场力( $F_e$ )进一步与细菌相关。在无其它 $\zeta$ 电位源下, $F_z$ 为零并且如果电场力 $F_e$ 也为零,那么作用于细菌的仅有的其它力为浮力和重力;在这样的情况下,应会发生沉降。

[0066] 电力通常由 $\zeta$ 电位相关的理论描述。 $\zeta$ 电位由围绕包含松弛结合的离子的颗粒的流体区域界定。 $\zeta$ 电位为胶质系统(其内具有细分散固体的流体,例如尿)的驱动力。 $\zeta$ 电位的大小决定系统是否稳定(颗粒维持结构)或不稳定(根据流体的比重颗粒将沉降或漂浮)。系统(细胞和周围的液体)从宏观角度将为电中性的,这是因为抗衡例子(具有与颗粒表面上的束缚电荷的相反电荷的离子)将以一般不大于几十纳米的小层围绕细胞。细菌的天然负电荷为细胞充当作为ATP(三磷酸腺苷)能量转换的一部分的“质子泵”的副产物。实际上细菌将试图建立跨越其膜壁的pH梯度以促进ATP转移,这导致细菌的净负电荷。另外,从离子化尿样品发现 $\zeta$ 电位并且存在大量电活动性,在细菌处于水环境(或其它非离子流体)中和由于质子泵该功能仍旧存在(斥力会轻微减小)的情况下这是一个重要的考虑。在流体中,颗粒和抗衡离子会具有可作用以排斥其它相似离子和维持分散的局部电荷。如图1A和1B的自由体受力图中所示,对于尿胶质系统 $\zeta$ 电位为最大的驱动因素。尿中的多数颗粒将不具有足够的 $\zeta$ 电位以克服由重力引起的沉降力,因为颗粒质量相对于来自 $\zeta$ 电位的力会较大并且颗粒会沉降。然而,细菌具有小颗粒质量, $\zeta$ 电位大到足以保持胶质系统悬浮。本发明方法利用细菌的这一自动排列现象并且使用其在尿样品中检测和评估细菌以及测定其浓度。

[0067] 更具体地,用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法包括在预定的一段时间(例如约3分钟-约10分钟或更久)以允许样品中的非细菌碎片沉降至容器底部之后,以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取一个或多个穿过包含一定体积的液体样品的可消耗(即,可丢弃)容器,优选聚合物容器的光学切片的步骤。过去预定的一段时间后,细菌在液体样品中自动排列,形成基本上遍及大部分液体样品(除了,在一些情况下,在容纳液体样品的可消耗容器的聚合物表面附近的“无细菌地带”中)的三维均匀间隔的格子样网格模式。因此,穿过自动排列的细菌的体积的光学切片可用于测量位于该切片中的细菌的数量。知道容器所容纳的液体总体积,可计算至少所包含体积内的总细菌的近似值。

[0068] 光学切片可垂直穿过液体样品发生,在体积内的不同高度水平发生,或与垂直或水平成一定角度穿过液体样品发生,如前述Olesen等人发表的美国申请所教导的。当进行这样一个倾斜的样品光学切片时,优选光学切片关于垂直的角度为约七(7)度。由于过去预定的一段时间后非细菌“碎片”沉降至容器底部,可进行水平光学切片,系统照相机的焦平面关于多个深度配置,例如容器底部上方50微米、100微米和150微米。

[0069] 当容器所容纳液体样品的一个或多个光学切片已经实施时,可定量并且可平均每一切片中所存在的细菌的数目。通过知道照相机的视野深度(camera's depth of field),或换句话说,其中出现在切片中的细菌被对焦并且可鉴定为位于该切片中的光学切片的深度,并且通过知道容器所容纳的液体样品的体积,来自样品光学切片的细菌的平均数目,乘以宽度、深度或对角穿过液体样品体积内(within the width, depth or diagonally through the volume of liquid sample)的光学切片的数目,将产生至少容器所容纳的给定体积的样品的细菌总数的近似值(例如每微升的细菌计数)。测量和计算可根据该方法自动地通过成像仪器进行并且不需要任何在使用常规方法(例如通过使用亮视野显微术)时普遍的就医药技术人员而言冗长乏味的或手动的评估。

[0070] 或者,再次通过光学切片,可进行测量以估计细菌之间的平均间隔。该平均颗粒间

隔可用作估计容器所容纳的液体样品体积中的细菌浓度的手段,代替尝试计数细菌。更具体地,可能不需计数细菌(以便增加细菌已经沉降的置信度)而是可然后使用统计学测定单一焦平面中细菌之间的距离。然后将距离平均并且可使用算法察看不同的焦深度(focal depth)以确保自动排列是完全的或至少指示细菌而不是非细菌。测定细菌(或其它颗粒)之间的平均间隔的方法包括评估图像中代表细菌的所有区域和评估其可用于测量同一焦平面中的颗粒之间的光程的焦点曲线(成角度的光学提供对焦或散焦的(in- and out-focus)图像的物体堆栈)。该程序跨越所有焦平面重复并且基于平均统计学可产生颗粒的3-d图。

[0071] 如先前所提及的,似乎存在位于聚合物材料所形成的容器表面附近的“无细菌地带”。正如细菌,聚合物在流体介质中具有 $\zeta$ 电位。这样的聚合物包括丙烯酸材料,例如聚(甲基丙烯酸甲酯)或PMMA,其为优选的制作本发明可消耗容器的材料。

[0072] 图11A和11B为聚合物基底和相关细菌的自由体受力图。图11A中所示的为与细菌和聚合物表面相关的力。术语 $F_{zb}$ 代表细菌的 $\zeta$ 电位力;术语 $F_{zp}$ 代表聚合物基底的 $\zeta$ 电位力;术语 $F_b$ 代表浮力,其等于流体样品的密度乘以细菌的体积乘以 $g$ (重力);术语 $F_g$ 代表重力,其等于细菌的质量乘以 $g$ (重力)。图11A清楚表明相等和相反的力会维持将允许细菌自动排列而不沉降的静态结构。此外,可消耗容器的 $\zeta$ 电位会在聚合物表面附件建立“无细菌地带”,这会在容器的顶部和底部以及其侧面二者处发生。此外,杆状细菌比球形细菌更大,会具有更多的质量和更可能以重力克服 $\zeta$ 电位并且至少部分沉降,或至少会显示不同的“无细菌地带”厚度,因为重力会克服更多的电力。

[0073] 如图11B中所示,样品中的若干细菌会具有相互作用,引起自动排列,并且会抑制沉降以及会维持聚合物可消耗容器的表面附近的“无细菌地带”。

[0074] 因此,一旦非细菌碎片已经与尿样品中的细菌分离,接近聚合物容器底部(或顶部)的焦平面的液体样品的光学切片,和距聚合物容器顶部和底部的相对距离的另外光学切片,将导致尿样品中不同类型的细菌的至少近似浓度的测定和评估,因为一些细菌,例如较高质量杆菌,将占据“无细菌地带”,而具有较小质量并且不太可能以重力克服 $\zeta$ 电位的球形细菌将保持悬浮并且在“无细菌地带”之外并且将在液体样品体积中自动排列。

[0075] 附图的图2-10描绘根据本发明形成的用于容纳液体样品的可消耗容器的多种形式,其特定结构帮助分离非细菌“碎片”与细菌并且所述容器帮助实施本发明用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法。优选地,所述容器作为可消耗产品形成,即,其可在使用后丢弃,并且由聚合物材料,例如丙烯酸PMMA制成。

[0076] 图2为根据本发明形成的可消耗容器的简化的横截面视图。在图2中,参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表容器底表面;参考字母C代表获取穿过容器所容纳的液体样品的光学切片的成像系统的照相机的焦深度;参考字母D代表容器细菌地带底表面。

[0077] 更具体地,图2的容器包括凹陷的底部部分和与凹陷的底部部分毗邻的未凹陷的底部部分。非细菌碎片会从液体样品沉降于凹陷的底部部分中。流体成像装置的光学系统的焦平面设置为接近或处于容器的未凹陷底部部分处以便仅细菌被检测到。因此,光学系统会扫描位于容器的非凹陷底部部分上方的颗粒。D处加入(incorporating)分离区,其中容器底部低于光学系统的焦平面,将实现其中沉降颗粒不会在视野中,仅留下细菌用于计数的条件(等待适当的沉降时间后)。

[0078] 图3-5代表与本发明的方法一起使用的容器的其它实施方案,其利用流体中细菌与非细菌的天然分离。更具体地,图3为根据本发明形成的容器的另一种形式的简化的横截面视图。再次,参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表容器底表面;参考字母C代表用于沉降颗粒的照相机焦深度;参考字母D代表用于细菌的照相机焦深度。在图3中所示的一个具体的实施方案中,容器顶表面和底表面互相平行,但光学询问在流体内的不同深度发生。较重颗粒(“碎片”)从液体样品中沉降下来并且位于容器的底表面,即,在“C”照相机焦深度,而自动排列的细菌在液体样品的体积中占据相对于容器的底部更高的水平并且在位于“D”的照相机焦深度处捕获。

[0079] 图4为根据本发明形成的容器的又一个实施方案的简化的横截面视图,其中参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表容器底表面;参考字母C代表用于沉降颗粒的照相机焦深度;参考字母D代表用于细菌的照相机焦深度。正如可从图4看到的,所述容器包括关于水平线倾斜(sloped to the horizontal)的底表面以便在固定的垂直位置处(在“C”处,接近容器较浅部分的倾斜底表面)询问会检测沉降的颗粒,而在固定的垂直位置“D”(实际上处于距倾斜底表面更高的水平,尽管其在与焦深度“C”相同的焦平面内)处询问会只检测液体样品中的细菌。

[0080] 图5为用于实施所述检测和定量液体样品中的细菌的方法的根据本发明形成的容器的进一步的实施方案的简化的侧视图。在图5中,参考字母A代表容器;参考字母B代表用于沉降颗粒的照相机焦深度;参考字母C代表用于细菌的照相机焦深度。图5中所示的容器优选为顶部开放的微量滴定板孔,并且用于实施其中所包含的液体样品体积的光学切片的光学系统在不同深度询问流体。“B”处的照相机焦深度接近或位于孔的底部并且检测沉降的颗粒,而高于孔底部的“C”处的照相机对焦深度检测自动排列的细菌。

[0081] 图6为根据本发明构建的并且用于实施所述用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法的容器的另一种形式的简化的顶视图。更具体地,参考字母A代表容器左表面;参考字母B代表容器右表面;参考字母C指示流体流动开始区域;参考字母D,以箭头形式,代表穿过容器的流体流动;参考字母E代表容器中形成的流体流动通道。流体流动通道可由容器左和右表面之间从其底表面向顶表面垂直向上延伸的一系列平行板界定。容器中位于毗邻板之间的流动通道促进流体的毛细管流。

[0082] 在图6中所示容器的优选形式中,存在数个由平行配置的板界定的向内部(inwardly)并接近容器的左表面和容器的右表面形成的流体流动通道,并且这些左侧和右侧流体流动通道沿容器的长度轴向延伸。还存在流体流动开始区域C附近的彼此间隔开并且完全横跨容器的宽度从其左表面向右表面延伸的平行配置的流体流动通道。这些通道也由毗邻的板界定,并且可以以相互增加的轴长度在区域C附近从容器的纵向中心以对称的方向朝外向其左和右表面延伸。

[0083] 因此,结合在容器中的流动特征增加表面区域(相对于流体体积)并提供对流体流动的导引。

[0084] 促进图6的容器中的流体流动的替代结构可包括减少流体流动通道尺寸(宽度和深度)以提供增加的相对于体积的表面积和促进毛细管流。或者,形成界定通道的板的材料可以以足够的接触角度(亲水性)选择以支持穿过容器的毛细管作用。此外,可在容器的左和右表面上以及界定其间的通道的板表面上进行表面处理以促进穿过容器的流体流动,这

样的处理包括等离子处理、电晕处理、表面化学反应或应用表面活性剂。这些实施方案将利用毛细管作用用于让流体流动进入和穿过容器。进一步的促进流体流入和流过容器的备选方法设想为包括开放系统,其中流体仅滴在或沉积在容器上,或封闭系统,其中将流体机械泵入容器中。

[0085] 对图2中所说明的容器的改良的简化的横截面视图在附图的图7中示出。图7中的参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表容器的非凹陷底表面;参考字母D代表界定细菌检测地带的容器的凹陷底表面;参考字母E,以箭头形式,代表穿过容器的流体流动;参考字母C代表从容器底部向上延伸并部分进入借此所容纳的液体样品的体积的凸出物。突出物充当关于流体轴向穿过容器的流动,如参考字母E所示,的“减速路障”。(应理解的是术语“减速路障”在本文中用于促进对本发明的总体理解;然而,应认识到流体实际上在突出物上会以更快的速度前进,因为体积流恒定并且在“减速路障”处横截面积小。)凸出物C使较致密的颗粒停止继续沿容器向下和流入“D”处的细菌地带。因此,正如图2中所示的容器,图7中示出的这一特定容器包括B处的非凹陷底表面,接着为D处的毗邻的凹陷底表面,所述凹陷底表面界定流过凸出物C后细菌以自动排列位于其中的“沟”。

[0086] 优选地,图7中所示的容器界定一个相对长的轴向穿过其的通道,流体可在其中流动。随着流体沿容器所界定的通道向下流动,颗粒将从液体样品沉降下来,并且较致密的颗粒将在通道开始时,在凸出物C之前浓缩,较不致密的颗粒将在容器通道的下游进一步沉降。该现象可通过应用通道中的流动特征而放大,所述通道中的流动特征经由尺寸或经由通道内的垂直位置分选成分。

[0087] 更具体地,图7中所说明容器的变更在附图的图8中示出,但无凹陷底表面。在图8中,参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表底表面,其与顶表面平行;参考字母C代表从容器底表面向上延伸并部分进入借此所容纳的液体样品的体积的凸出物;参考字母D通过箭头代表轴向穿过容器的流体流动的方向。因此,如可从图8看到的,本发明的这一特定容器包括在容器轴长度的至少一部分上的多个周期性地间隔开的凸出物,或“减速路障”。这些沿容器的长度相隔一定距离放置的凸出物C会导致仅流体深度中高处的那些颗粒继续沿容器所界定的通道向下并提供特定密度范围的颗粒将积累的询问区。

[0088] 图9说明用于实施本发明用于在液体样品中检测和测定细菌的浓度的方法的容器的又一种形式。图9中所示的实施方案与图8中所示的相似,除了图8中的凸出物C在图9的实施方案中被不同尺寸的滤器代替。在图9中,参考字母A代表容器顶表面;参考字母B代表容器底表面,其不包括凹陷部分;参考字母D通过箭头代表轴向穿过容器的流体流动的方向,所述容器,与图8中的容器一样,界定了相对长的用于流体流动的通道;参考字母C代表代替凸出物的滤器。

[0089] 更具体地,并且如图9中所示,存在多个在容器的底表面和顶表面之间延伸并且流体样品以方向D流过的滤器。滤器以与图8的实施方案中凸出物间隔相同的方式在容器轴长度的至少一部分上彼此间隔开。优选使用不同孔径的滤器。更具体地,上游滤器优选具有比下游滤器更大的孔径,以致滤器在流体流动方向D上孔径减小。滤器将拦阻具有不同尺度的颗粒以致这些颗粒将在滤器之间的区域积累,并且这些区域可通过光学切片等询问以检测和评估每个区域中积累的颗粒类型。较小的颗粒例如细菌,其为1微米大小,将通过所有的滤器并且将在容器下游末端的区域积累,在此处可测定和定量这样的细菌。

[0090] 图10A和10B分别为容器的简化的顶视图和横截面视图,并且说明了为质量保证目的而在容器的底表面中或上形成的多个间隔开的凹陷或凸出物,或颗粒。流体的光学评估应包括用以确认系统对焦,放大率适当并且光学特征适当分辨的参考。这些特征(未按比例绘制)代表流体样品中的标准成分并且,在样品来自无有形成分的健康宿主时,提供焦点参考和确保光学功能正常的手段二者。这些特征的优选实施方案,如图10A和10B中所说明的,会使其以最佳焦点位置结合入容器底表面中或附近。这样的特征可为形状,并且可包括当可消耗容器为制作的时掺入的粗糙化表面,例如,塑造入容器的底表面,或在例如其中所述特征激光标记在容器上的封闭制造工艺(close fabrication process)中,例如,或作为固定的小珠或乳胶颗粒,例如,位于容器的底表面。所述特征将位于最佳焦点处以便任何样品均可在光学系统中以适当的置信度分析。当仅鉴定到质量保证特征并且没有其它物体时,检验尿样品之后的阴性结果,其中未检测到细菌或其它颗粒,会验证为准确的。在图10A和10B中,字母“A”代表凹陷,字母“B”代表凸出物,字母“C”代表颗粒。

[0091] 图10中所示容器的简化的顶视图为这种质量保证特征的一个可能的实现。这样的凸出物、凹陷或颗粒的尺寸、形状、衬比度、位置和间隔设计为确保目的成分的光学清晰度和辨别度。

[0092] 用于实施本发明用于检测或测定液体样品中的细菌浓度的方法的容器的又一种形式在附图的图24-28中示出。一般而言,所述容器为具有手柄部分4和从手柄部分4朝外轴向延伸的(发生样品成像的)阅读区部分6的伸长成员2形式。手柄部分4和阅读区部分6包括样品容器的外壳。如在先前所述的样品容器的其它实施方案中,该具体的实施方案也被制造造成可消耗的元件,即,使用之后,所述样品容器根据所需的安全方案处理。

[0093] 接收液体样品到其中的入口8位于其手柄部分4上方的外壳的顶表面上。入口8与沿样品容器的阅读区部分6的长度的至少一部分轴向延伸的内部伸长的液体样品孔10流体连通。孔10容纳通过入口8放置(deposited)在样品容器上的液体样品,例如尿,并且在外壳的顶和/或底表面上界定发生孔10中所包含液体样品的成像的区域。

[0094] 细菌阅读区12位于与手柄部分4轴向相反并且与孔10连通的样品容器外壳的阅读区部分6的末端。更具体地,细菌阅读区12组成包含液体样品的孔10的末端部分并且优选包括在孔10的细菌阅读区部分的轴长度上的以朝向外壳的阅读区部分6的末端的方向深度增加的一个或更多个具有递增的深度的毗邻区段,其在一些方面与附图的图2中所示的样品容器(其具有两个不同深度的区段)相似。用于成像图24-28中所示的样品容器的流体成像装置的光学系统将扫描液体样品孔10的一个或多个区段中的颗粒,以及位于细菌阅读区12中的自动排列的细菌。如先前关于图2中所示的样品容器的实施方案所提及的,不自动排列的较重颗粒,例如有形成分,会沉降到孔10的底部而不依赖于孔深度,留下细菌用于在一个或多个远离底部的体积区段(即,样品容器孔10的中间水平区段,包含流体的体积)中计数。当填充样品容器时,所有成分(有形成分、细菌、碎片、脂类,等)将遍及流体体积随机分布。由于细菌不像大部分有形成分一样沉降,其可更容易地在不再存在有形成分的流体体积中观察和区分。自动排列的细菌优选在孔10末端的细菌阅读区12中测量。

[0095] 孔10的细菌阅读区12优选包括不同深度的三个区段,即,第一个区段22、毗邻第一个区段22的第二个区段24和毗邻第二个区段24并在其之后的第三个区段26。更具体地,孔10在样品阅读部分6之上的深度优选为约250微米。第一个区段22优选约450微米深,位于其

中的细菌在约200微米的深度光学阅读。第二个区段24优选约650微米深,位于其中的细菌在约400微米的深度光学阅读。第三个区段26优选约850微米深,位于其中的细菌在约600微米的深度光学阅读。

[0096] 为了促进对本发明的完全理解,此刻将进一步描述用于实施本文先前所公开方法的方法和容器。

[0097] 根据本发明的一种形式,用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法包括在经过预定的时间以允许液体样品中的细菌自动排列之后,在所述液体样品的体积中以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取至少一个穿过液体样品的体积的光学切片,和计数所述至少一个光学切片中存在的细菌的数目的步骤。观看沉降现象以确定最佳评估时间是可能的,因为可创造(fabricate)算法以确定何时沉降完成并且仅自动排列过程成为正在发生的活动。还可能作出一个不必等待完全沉降而是改为观察样品和处理出正在沉降的颗粒并仅评估具有细菌特性的样品部分的预测性算法。所述方法的步骤还包括计算液体样品的体积可分成的光学切片的数目从而测定可能的光学切片的总数,将所述至少一个光学切片中存在的细菌的数目乘以可能的光学切片的总数从而测定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值并基于液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值测定液体样品中的细菌浓度。

[0098] 允许液体样品中的细菌自动排列的预定时间优选为约3分钟-约10分钟或更久。此外,所述穿过液体样品的体积获取的至少一个光学切片优选具有相对于穿过体积的垂直平面约7度的焦平面角度。或者,所述穿过液体样品的体积获取的至少一个光学切片具有相对于穿过体积的垂直平面约0度的焦平面角度(即,焦平面为垂直的),或相对于穿过体积的垂直平面约90度(即,焦平面为水平的),或其间的角度。如果光学切片的焦平面穿过液体样品的体积水平配置,那么优选所述光学切片具有液体样品体积的底部上方约100微米的焦平面深度。或者,焦平面深度可为500微米,或更多,以除去来自大沉降物体的光晕(光学视野深度和散焦深度的函数)。或者,通过样品容器的光学切片的焦平面深度可处于在液体样品的体积上约100、约200、约400、约600、约800、约1000和约1200微米的至少之一。

[0099] 在本发明的另一种形式中,用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法包括在经过预定的时间以允许液体样品中的细菌自动排列之后,在所述液体样品的体积中以预定的视野和以一个或多个预定的焦平面深度或角度获取多个穿过液体样品的体积的光学切片,和计数多个光学切片的每一光学切片中存在的细菌的数目的步骤。所述方法的步骤进一步包括通过多个光学切片中存在的细菌的总数除以穿过液体样品的体积获取的光学切片的数目计算存在的细菌数目的平均值从而测定所述多个光学切片的光学切片中存在的细菌的平均数目,计算液体样品的体积可分成的光学切片的数目从而测定可能的光学切片的总数,将所述多个光学切片的光学切片中存在的细菌的平均数目乘以可能的光学切片的总数从而测定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值并基于液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值测定液体样品中的细菌浓度。

[0100] 在本发明的又一种形式中,用于在液体样品中检测细菌和测定其浓度的方法包括在经过预定的时间以允许液体样品中的细菌自动排列之后,在一定体积中以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取至少一个穿过液体样品的体积的光学切片,和测定所述至少一个光学切片中存在的细菌之间的平均间隔从而测定平均细菌间隔的步骤。然后,计算

液体样品体积所占据的三维区域从而测定三维体积区域(volumetric area),将三维体积区域除以细菌之间的平均间隔从而测定液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值并基于液体样品的体积中的细菌总数的至少近似值测定液体样品中的细菌浓度。

[0101] 在本发明的又一种形式中,用于检测液体样品中的颗粒和区分液体样品中的第一种颗粒类型与至少第二种颗粒类型的方法包括用一定体积的包含所述第一种颗粒类型和至少第二种颗粒类型的液体样品至少部分上填充容器的步骤,所述容器具有至少一个由引起液体样品中的至少第二种颗粒类型对其表现出厌恶并且液体样品中第一种颗粒类型不对其表现出厌恶的预定材料制成的表面。液体样品中的至少第二种颗粒类型的颗粒主要不占据接近容器表面的液体样品体积的厌恶区,并且液体样品中的第一种颗粒类型的颗粒不占据(do not occupy)接近容器表面的液体样品体积的厌恶区。然后,以预定的视野和以预定的焦平面深度或角度获取至少一个穿过液体样品体积的厌恶区的光学切片。所述光学切片光学上检测占据接近容器表面的液体样品体积的厌恶区的第一种颗粒类型的颗粒,区别于主要不占据厌恶区的至少第二种颗粒类型的颗粒。

[0102] 优选地,引起至少第二种颗粒类型的颗粒对其厌恶的容器表面由丙烯酸材料制成,并且更优选由聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)制成。引起细菌厌恶的其它材料包括,但不限于,聚苯乙烯和环烯烃聚合物(COP)。

[0103] 现在,将接着进一步描述可用于实施本文所公开的本发明方法的容器的多种形式。在本发明的一种形式中,并且如附图的图2中所示,用于容纳一定体积的液体样品并且用于分离液体样品体积中的不同颗粒类型的容器包括具有凹陷部分和毗邻凹陷部分的非凹陷部分的底壁,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括在容器所容纳液体样品的体积中自动排列的第一种颗粒类型和不在液体样品的体积中自动排列的第二种颗粒类型。所述容器借此界定位于液体样品体积中的第一个深度并且与容器底壁的非凹陷部分垂直对齐的第一地带,和位于液体样品体积中的第二个深度并且与容器底壁的凹陷部分垂直对齐的第二地带。自动排列的第一种颗粒类型倾向于占据容器内的第二地带,不自动排列的第二种颗粒类型倾向于占据容器内的第一地带。

[0104] 如附图的图8中所示,上述用于容纳一定体积的液体样品的容器可进一步包括至少一个凸出物,所述至少一个凸出物从容器底壁的非凹陷部分向上延伸并且至少部分进入容器所容纳液体样品的体积。所述至少一个凸出物位于接近底壁凹陷部分的底壁非凹陷部分上。所述至少一个凸出物进一步起作用以分离自动排列并且倾向于占据容器中的第二地带的第二种颗粒类型与不自动排列并且倾向于占据容器中的第一地带的第二种颗粒类型。

[0105] 或者,并且同样在附图的图8中示出,根据本发明形成的用于容纳一定体积的液体样品并且用于分离液体样品体积中的不同颗粒类型的容器包括底壁和在容器轴长度的至少一部分上的彼此间隔开的多个凸出物,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括在容器所容纳液体样品的体积中自动排列的第一种颗粒类型和不在液体样品的体积中自动排列的第二种颗粒类型。所述凸出物从容器底壁向上延伸并且至少部分进入其中所容纳的液体样品的体积。所述凸出物界定了第一地带和与第一地带毗邻的至少第二地带。自动排列的第一种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器中的第一地带,不自动排列的第二种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器中的至少第二地带。

[0106] 在本发明的又一种形式中,并且如附图的图9中所示,用于容纳一定体积的液体样

品并且用于分离液体样品体积中的不同颗粒类型的容器包括底壁,和从底壁向上延伸并至少部分进入容器所容纳的液体样品的体积的至少一个滤器,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括呈现第一个尺寸的第一种颗粒类型,和呈现与第一种颗粒类型的颗粒所呈现的第一个尺寸不同的第二个尺寸的第二种颗粒类型。所述至少一个滤器具有第一个轴侧面(axial side)和位于第一个轴侧面对面的第二个轴侧面。所述容器界定了位于至少一个滤器的第一个轴侧面旁的液体样品体积中的第一地带,和位于至少一个滤器的第二个轴侧面旁的液体样品体积中的第二地带。所述至少一个滤器具有允许液体样品的第二种颗粒类型的颗粒通过所述至少一个滤器并进入第二地带中的预定孔径,借此第一种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器内的第一地带,并且第二种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器内的第二地带。

[0107] 如同样可通过附图的图9看到的,根据本发明形成的用于容纳一定体积的液体样品并且用于分离液体样品体积中的不同颗粒类型的容器包括底壁和在容器轴长度的至少一部分上的彼此间隔开的多个滤器,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括呈现第一个尺寸的第一种颗粒类型,和呈现与第一种颗粒类型的颗粒所呈现的第一个尺寸不同的第二个尺寸的第二种颗粒类型。所述滤器从底壁向上延伸并至少部分进入容器所容纳液体样品的体积。所述多个滤器界定了至少液体样品体积中的第一地带和液体样品体积中的第二地带。所述多个滤器的每一滤器具有与下一个相邻滤器的孔径不同的孔径。至少一个滤器具有允许第一种颗粒类型的颗粒通过其并且不允许第二种颗粒类型的颗粒通过其的孔径,借此第一种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器中的第一地带,并且第二种颗粒类型的颗粒倾向于占据容器中的第二地带。

[0108] 在本发明一个替代的形式中,并且如附图的图4中所示,用于容纳一定体积的液体样品并且用于检测液体样品体积中的不同颗粒类型的容器包括底壁、第一个轴末端和位于第一个轴末端对面的第二个轴末端,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括在容器所容纳液体样品的体积中自动排列的第一种颗粒类型和不在液体样品的体积中自动排列的第二种颗粒类型。所述底壁具有倾斜的表面以将容器界定成具有相对更接近其第一个轴末端的较浅区段和相对更接近其第二个轴末端的较深区段,使得在液体样品的体积中具有恒定的焦平面深度的并且通过光学成像仪器获取的所述容器所容纳液体样品体积的水平配置的光学切片会在与容器的较浅区段对齐的光学切片的部分中检测不自动排列的第二种颗粒类型的颗粒,并且会在与容器的较深区段对齐的光学切片的部分中检测自动排列的第一种颗粒类型的颗粒,所述焦平面深度选择为在较浅区段上与容器底壁非常接近。

[0109] 图10A和10B描绘根据本发明所形成的容器的另一个实施方案。用于容纳一定体积的液体样品并且用于检测液体样品中的不同颗粒类型的该实施方案的容器包括底壁,和用于质量保证目的在底壁中形成的或位于与容器的底壁接近处的多个间隔开的凹陷、凸出物或颗粒,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括第一种颗粒类型和第二种颗粒类型,第一种颗粒类型的颗粒在容器所容纳的液体样品的体积中自动排列或具有第一个尺寸,第二种颗粒类型的颗粒不在容器所容纳的液体样品的体积中自动排列或具有与第一种颗粒类型的颗粒的第一个尺寸不同的第二个尺寸。

[0110] 在本发明的又一种形式中,并且如附图的图6中所示,用于容纳一定体积的液体样

品并且用于检测液体样品中的不同颗粒类型的容器包括底壁和多个平行配置的和间隔开的板,所述容器所容纳的液体样品体积中的不同颗粒类型包括第一种颗粒类型和第二种颗粒类型,第一种颗粒类型的颗粒在容器所容纳液体样品的体积中自动排列或具有第一个尺寸,第二种颗粒类型的颗粒不在容器所容纳液体样品的体积中自动排列或具有与第一种颗粒类型的颗粒的第一个尺寸不同的第二个尺寸。所述板从容器的底壁垂直向上延伸并且至少部分进入容器所容纳的液体样品的体积,其中所述多个平行配置的板的毗邻板界定其间的流体流动通道。优选地,所述容器包括相对的侧壁以及第一个轴末端和位于第一个轴末端对面的第二个轴末端,所述相对的侧壁与底壁连接并从其向上延伸。优选地,所述多个平行配置的板的至少一些板具有从容器的纵向中心以对称方向朝外向其对面的侧边增加的不同的轴长度,例如附图的图6中所示。

[0111] 细菌自动排列已经用相关的模型和实验数据证明。自动排列模型提供对前述情况的深刻见解(insight),并且如下所述,可使用高级处理在非细菌伪迹(artifacts)存在下定量液体样品中的细菌。具体的实例包括会倾向于漂浮的脂类和可能以比有形成分更慢的速率沉降的碎片。基于关于这些成分在尿中会如何表现以及细菌会如何表现的概念模型产生了数种算法方法,每一算法方法均提供对流体体积中见到的成分的深刻见解。描述所述算法方法以促进理解其如何帮助区分尿样品体积中的细菌与非细菌。另外,示出了整合模型以描述这些完全不同的算法方法可如何组合以产生适当的细菌浓度,甚至在这些伪迹存在下。

[0112] 对于细菌描述的自动排列理论与固态物理学晶体结构模型相关的理论一定程度上相似。关键为在受限空间中细菌将具有会以排斥的方式与其它带电荷的细菌相互作用的表面电荷(这以忽略细菌变得太近以致范德华吸引力支配相互作用的情况为前提)。由于细菌在受限的环境中并且不能无限远离彼此移动,其将调整(orient)自身成为其中总系统处于最小能量水平的状态,如图11B中所示。每个细菌具有相同质量、体积和表面电荷的简单二维模型在附图的图12中示出并且说明细菌会以相对于彼此相等的间隔排列其自身。

[0113] 图12中的图表代表其中细菌成分的数目完全和均匀地填充样品容器,例如可消耗(可丢弃)装置中的格子样空间的情形。如果该模型中少了一个细菌,那么所得的模型将类似图13A中所示的图形。另一方面,如果细菌计数从9增加至16,那么天然间隔会变为此刻均匀一致的更小距离以为系统提供最小能量状态,如图13B中所示。

[0114] 当从垂直剖面而不是自顶向下的视图评估二维模型时,重力和浮力的作用开始显现。该稍微更复杂一些的模型将继续证明图13A和13B中所证明的电相互作用,但还将结合入物理特性。差异会在于当在样品容器的深度内向上或向下移动时获取的每一水平切片会与其余的稍微不同。在这种情况下,最低的深度会具有最高的细菌浓度以及水平之间最短的垂直间隔。在深度上向上移动会显示细菌计数的减少以及在深度方向上间隔的增加。由于格子结构的不完全填充,最上的水平行会显示计数和间隔的最宽变异。图14显示此种结构的三维模型的侧视图。图14中所示成分的橡皮糖形状与颗粒的电荷以及可消耗样品容器边缘相关的电荷有关。上面区域中较低的细胞浓度提供较小的力,样品容器的壁将细胞推向中间。

[0115] 在尿样品体积中的成像显示细菌遵循上述简单模型。评估流体体积中的细菌提供一种通过让重力加速有形成分沉降而细菌保持悬浮分离细菌与有形成分,例如红血细胞

(RBC)、白血细胞(WBC)、上皮细胞、管状物(casts)和晶体的简单方法。尿样品中的一些伪迹成分不显示大约100  $\mu\text{m}$ 沉降/分钟的标准有成分沉降概况。最常见的这些成分为脂类和碎片。

[0116] 脂类的评估提示其将不具有与细菌相同的电表面电荷并且会不与细菌电磁相互作用。脂类的密度会小于尿样品并且脂类将倾向于漂浮至样品顶部。填充样品容器会遍及流体随机分布脂类,然后随着时间推移脂类将上升。脂类还会在尺寸上显著不同,从约细菌的尺寸到更大。当脂类浓度较高时,在可能选择用来评估样品的细菌的区域(例如在最深的地带中距离样品容器底部650  $\mu\text{m}$ )会可能存在显著水平的脂类(包括与细菌尺寸相似的那些)。然后脂类与细菌之间的相互作用会在会存在细菌的样品容器的最顶层深度处具有最高水平的相互作用。图15中的图像显示在流体体积中包含脂类但无细菌的代表性样品。

[0117] 与脂类相似,碎片会具有广泛不同的尺寸,尽管由于较高的密度碎片会沉降。碎片的形状和小尺寸的范围可导致非常长的沉降时间,这是因为浮力和重力可具有相似但方向相反的力大小。这会导致有可能比细菌下落更快或更慢(尽管细菌会受的电力支配,同样,其会指示出最终停留位置)的大多随机分布的碎片概况(碎片也将不带电荷)。最后,碎片将保持随机分布、沉降或漂浮。图16显示在液体体积中包含碎片但无细菌的代表性样品。

[0118] 脂类和细菌将各自具有不同的穿过流体深度的分布,取决于其是否漂浮(脂类)、保持随机分布(碎片)或下沉(碎片)。穿过流体深度的分布然后会产生与会遵循自动排列模型的细菌不同的信息。不同深度以及不同点的及时(in time)评估会提供必要数据以区分细菌与这些干扰剂。图17A和17B显示在时间零点时(当样品容器刚刚填充时)(图17A)和发生一些沉降后(图17B)代表四种颗粒类型的每一的理论直方图的叠加以证明潜在的深度表现。时间和深度数据会分离不同的成分。

[0119] 本发明第一种“物体计数”算法方法可用于帮助区分尿样品中的细菌与非细菌并在下文描述。考虑细菌地带中成分的存在情况。使图像中分布的小点(代表细菌或其它小伪迹成分)可视化相当容易。由于测量在流体体积中捕获,因此没有被对焦平面并且每一图像会在图像的每一部分具有对焦或散焦的成分(不依赖于偏轴角)。直截了当的测量(straight forward measurement)可通过阈值化图像和从背景鉴定物体(例如,将每个像素变成灰度值然后选择某个阈值以上的任何像素为白色而所有其它像素为黑色)进行。计数所有单独的白色区域(每一相连的白像素会被认为是一个成分)将产生物体计数。一个原始图像实例和相关的阈值化图像分别在图18A和18B中示出。

[0120] 物体计数会提供可用于测定图像内的颗粒浓度的定量值。对于纯细菌样品,该计数会与细菌浓度直接相关。当与细菌同样的平面中存在其它颗粒时,那么物体计数会高于细菌计数。对于具有小颗粒并且无细菌的样品,将令人担忧的是会从分析产生细菌浓度(当应该报告为没有时)。从图17B,可以看到,如果让样品沉降适当的时间段,那么可能会存在其中浓度为仅细菌的“甜蜜点(sweet spot)”地带。

[0121] 本发明第二种密度算法方法可用于帮助区分尿样品中的细菌与非细菌并且在下文描述。物体计数分析直接接着进行密度分析(the density analysis follows directly from the object count analysis)。不同之处在于密度评估测定阈值化的成分(白色像素)与包含所有黑色像素的背景的比率(参见图18B)。该分析将细菌尺寸以及计数考虑在内。图18A中的图像可用于通过实施后处理工具例如阈值化测定密度以分离颗粒与背景,如

图18B中所示。密度具有提供浓度的度量的潜能。已知碎片和脂类将会具有不同的尺寸,图像中具有这些存在的影响将增加密度而不增加物体计数。比较来自这两种测量的定量值可开始鉴定非细菌成分是否为阈值化图像的一部分。

[0122] 本发明第三种“像素间隔”算法方法可用于帮助区分尿样品中的细菌与非细菌并且在下文描述。像素间隔意在测定流体体积中颗粒之间的平均距离。如果颗粒遵循自动对齐理论,那么颗粒之间的间隔会随浓度增加而减小。距离的标准偏差也应指示自动对齐过程是否发生或图像中是否存在不对齐的其它非细菌颗粒。一般方法为找出与来自图18B的相似的阈值化图像然后计算颗粒之间的最短欧几里德距离(即,最近的邻居)。然后通过计算这些距离的平均值和标准偏差测定像素间隔,如图19A和19B中所表示的。如图19B中所示,可修饰阈值图像以在相邻细菌之间添加后处理线20,其长度指示细菌与其最近的邻居细菌之间的间隔。

[0123] 可发展理论模型以基于细菌的尺寸和电荷、样品容器的大小以及允许对齐的时间描述像素间隔。该模型可通过经验数据确认。非碎片的影响在于像素间隔模型中会存在中断,人为缩小平均间隔和扩大标准偏差。

[0124] 本发明第四种“偏斜度”算法方法可用于帮助区分尿样品中的细菌与非细菌并在下文描述。偏斜度为数据集合的正态性的量度。正偏指示数据具有向右延伸的尾巴,而负偏指示向左延伸的尾巴,如图20A和20B中所示。对于任何图像均可计算偏斜度,如果灰度值的分布遵循高斯曲线,那么其会具有接近零的偏斜度。如果存在过度的尾巴,那么偏斜度值会表明如此。

[0125] 由于细菌会在整个流体体积中正态分布,偏斜度预期接近零。即使对于(with)当位于样品容器底部(对于沉降物体)时预期(intended)具有对焦的带和离焦的带的离轴图像,具有随机分布的颗粒的流体体积中的图像也会具有接近零的偏斜度。随着颗粒沉降,其将展示接近样品容器底部的偏斜度并且在体积的较高处会看不到。相似地,漂浮的物体会表示上部区域的偏斜度并且在样品容器的较低处会看不到。

[0126] 当细菌与干扰伪迹例如脂类和碎片一起存在时上文所述的本发明四种算法方法各自具有长处和弱点。各方法以整合的方式评估输出会提供额外的信息以帮助定量细菌和确定伪迹对值的潜在影响。考虑图17A中所示的理论模型。最初在样品中,所有的颗粒遍及流体体积随机分布,如图17A中所示。随着时间过去,致密颗粒将以一定速率沉降,低密度颗粒将以一定速率漂浮,细菌将定居于(settle into)自动对齐网格。图17B表明样品容器中存在细菌与非细菌可能完全分离的时机和空间。

[0127] 图17A中显示的“填充时间”直方图和图17B中显示的“沉降时间”直方图之间的第三个时间点是在图21中显示的直方图中描绘,此时颗粒分离已经开始但没有完成。

[0128] 图17和21清楚表明存在细菌会与污染物的子集而不是所描述的所有三种类型重叠的区域。此垂直分离可用于测定本发明四种算法的每一关于每一深度的成分的影响。通过实施穿过样品容器的垂直扫描,可将每一深度水平的成分影响与纯细菌滴定比较以测定浓度。通过在数个深度评估,可从数据提取不同的伪迹成分。另外,在填充样品容器后的不同时间实施垂直扫描还将提供会指示沉降/漂浮速率的时间分离。可整合所有这些输入以测定影响浓度值的污染物的浓度和速率潜能(concentration and rate potential for contamination impacting the concentration value)。

[0129] 考虑图22A (杆菌) 和22B (球菌) 中所示数据,其中细菌滴度在样品容器中,例如可消耗(可丢弃)装置,例如附图的图24-28中所示,使用标准细菌扫描(显示所有三个地带的的数据)和用“像素间隔”逻辑后处理评估,如先前所描述的。平均值和标准偏差二者的曲线分别在图22A和22B中显示,每一具有一个典型的拟合良好的幂级数曲线。由于该特定的样品容器具有随各地带降低的细菌地带深度,对于每一地带分析深度不同(例如距容器底部600、400和200  $\mu\text{m}$ )。对于每一地带其曲线重叠,这是因为样品为纯细菌并且样品中不存在干扰伪迹影响逻辑。存在随自动排列过程进展和系统在不同深度评估可实现的时间依赖曲线(可能是 $10^6/\text{ml}$ 浓度时指出的变更的原因)。

[0130] 考虑到图22A和22B中所示的校准曲线,细菌浓度可基于“像素间隔”平均值计算。若不存在干扰因素,那么该计算将完成。若存在潜在的干扰因素,那么来自先前所述其余算法的相似曲线的整合,以及在后续时间的再分析提供更多的信息以达到增加的准确度。

[0131] 可视化四种算法整合在一起的指导方法(对于该实例假定不存在时间影响)在图23A和23B中示出。该方法显示每一算法输出在三个纯细菌浓度时的参考曲线。具有标志的黑线A代表不包含细菌的天然样品。具有标志的灰线B代表掺入 $10^8$ 球菌/ $\text{ml}$ 的天然样品。在脂类和细菌二者的情况下,天然样品显示与参考曲线C、D和E显著的差异。当掺入 $10^8$ 球菌/ $\text{ml}$ 时,曲线B显示与相应的参考曲线C更大的相似性。为了增加更清晰,物体计数和像素间隔的评估显示,当二者均非常接近天然参考时,那么其为细菌浓度的良好表示。物体密度和偏斜度显示伪迹与掺入的细菌联合的影响。该表示显示如何可以从该数据类型创建整合模型。

[0132] 定量模型可从优选6个参考数据点建立:距填充的时间,在细菌地带中的垂直位置、物体计数、像素间隔、物体密度和偏斜度。应当指出的是对于四种算法的每一评估平均值、中位数和标准偏差均为可能的。对于每一时间和垂直位置(细菌地带依赖的),可创建对平均值、中位数和标准偏差的每一的纯细菌滴度的校准曲线(一般预期为幂级数拟合)。这12个值将会为来自测量的算法逻辑输入。然后适当的深度和时间点的拟合模型将会用于基于样品反应评估来自12种算法的每一的浓度估计。12种算法的整合可通过并入模糊逻辑曲线的专家系统实施以表征样品是否含有细菌。经测定具有细菌的样品将然后从参考曲线预测浓度。实际浓度可能需要第二个专家模糊逻辑系统,特别是其中伪迹可具有较大影响的低浓度细菌。有可能使用该方法并考虑距填充的时间,检测下限可降低至 $10^6$ 球菌/ $\text{ml}$ 以下。

[0133] 从前述描述明显看出,本发明方法可评估大量流体中的细菌并使用细菌的特性作为手段区分细菌与非细菌“碎片”。其为一种高灵敏度和选择性的用于检测细菌的方法,特别是在尿介质中,并且可用于测定液体样品中的细菌浓度。此外,根据本发明方法的一种形式,可测量细菌之间的平均间隔以估计细菌浓度,代替尝试计数细菌。

[0134] 附图的图2-10中所示的本发明容器的多种形式帮助实施检测和定量流体样品中的细菌以及分离细菌与非细菌“碎片”的方法。

[0135] 尽管本发明的说明性实施方案已经参考附图在本文中描述,应理解的是本发明不限于那些精确的实施方案,并且本领域技术人员可在其中作出多种其它改变和修饰而不脱离本发明范围或精神。

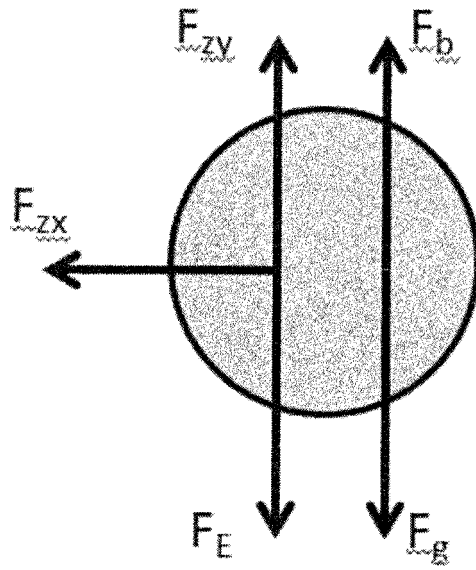


图 1A

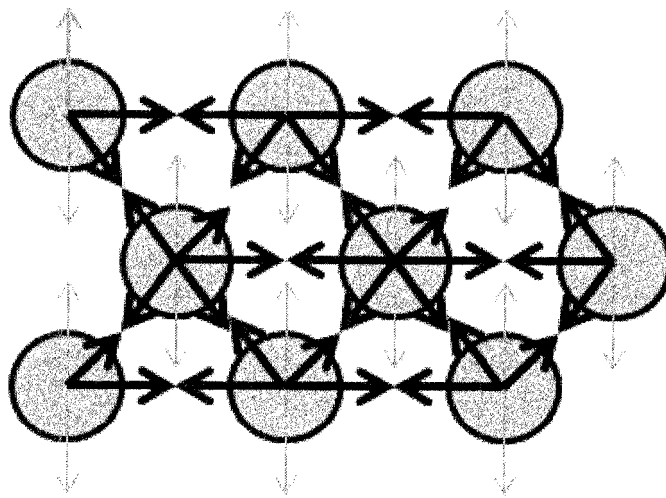


图 1B

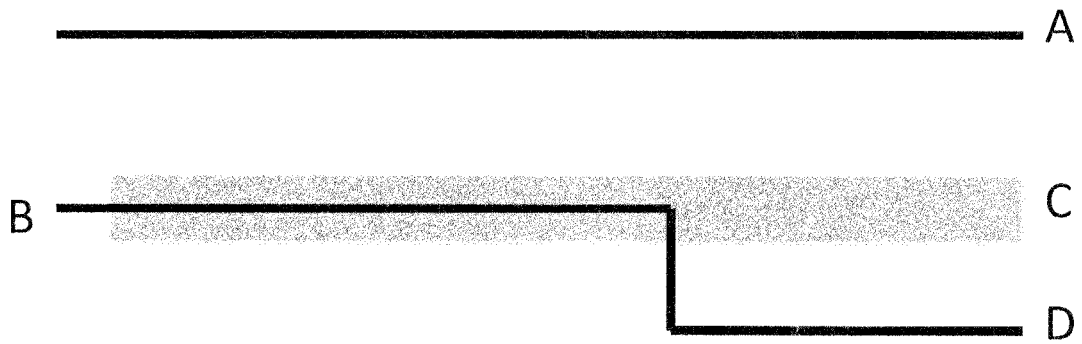


图 2



图 3

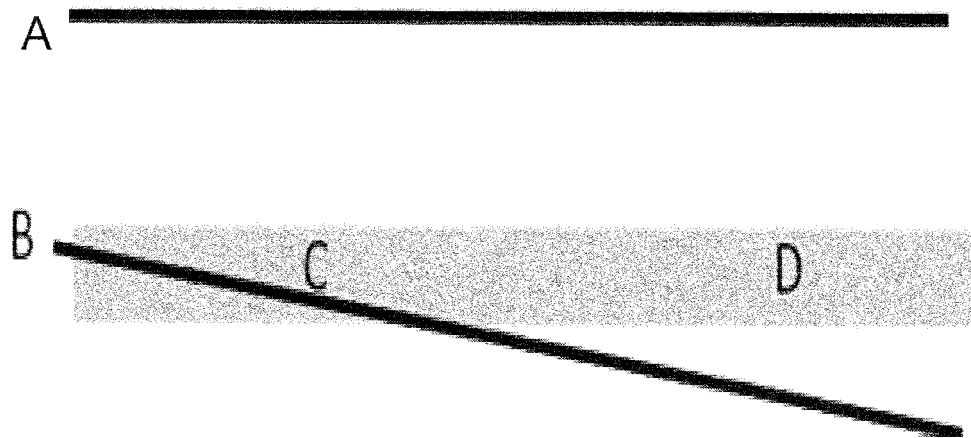


图 4

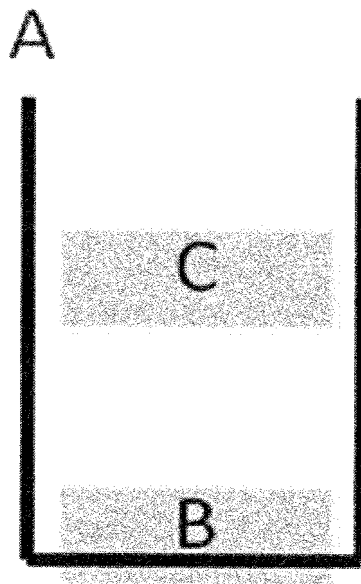


图 5

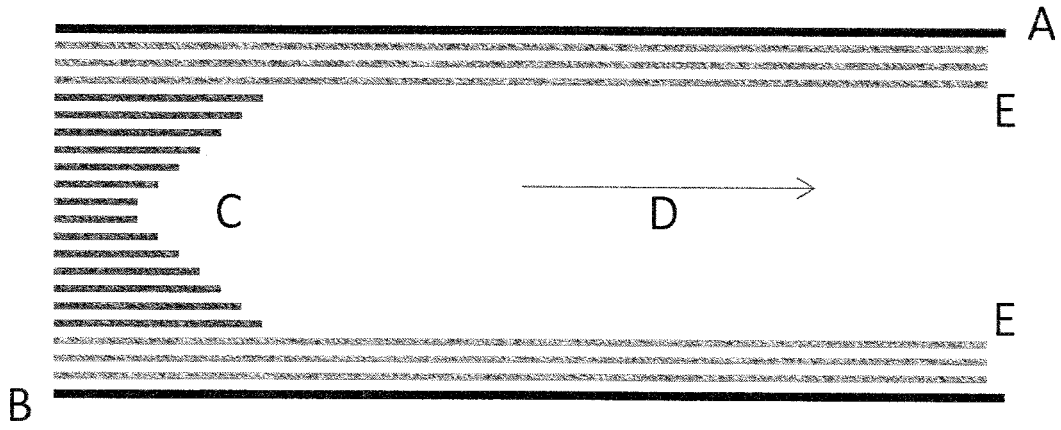


图 6

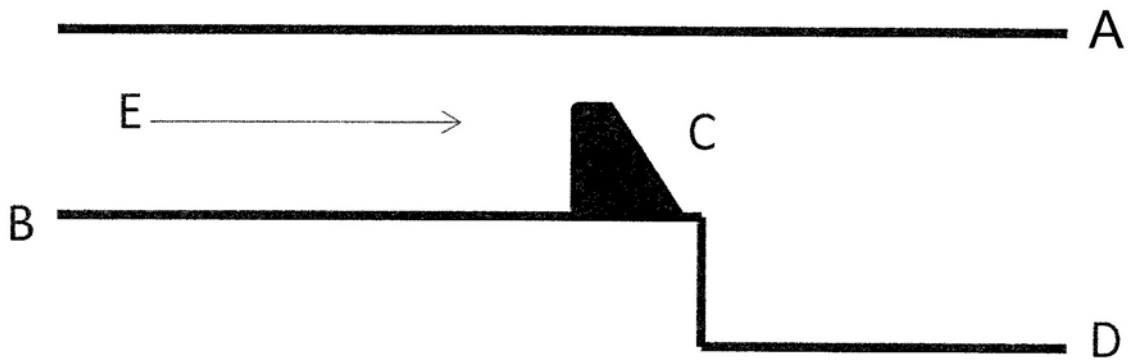


图7

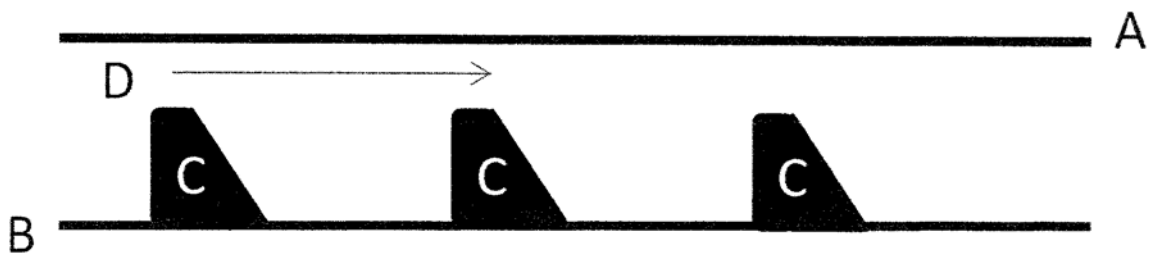


图 8

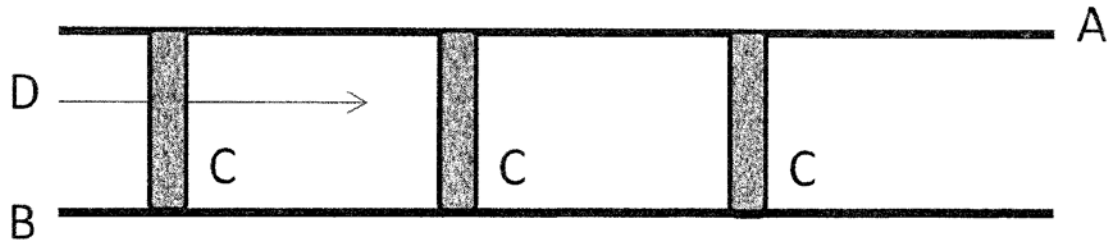


图 9

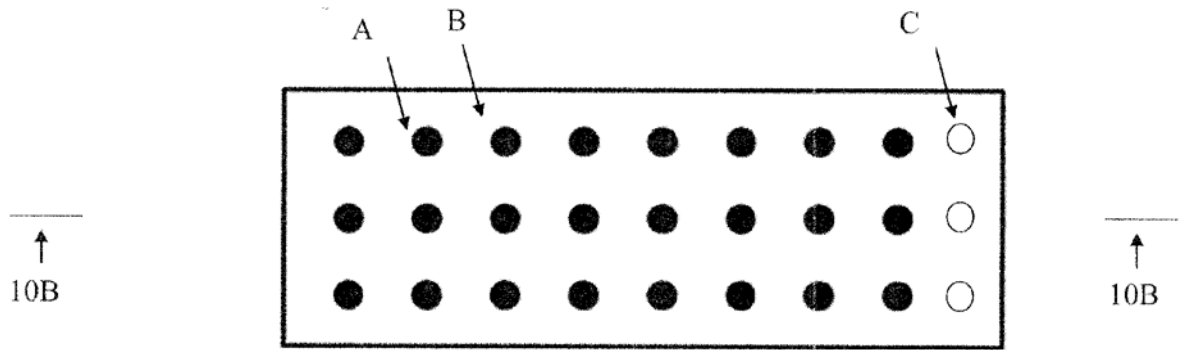


图 10A

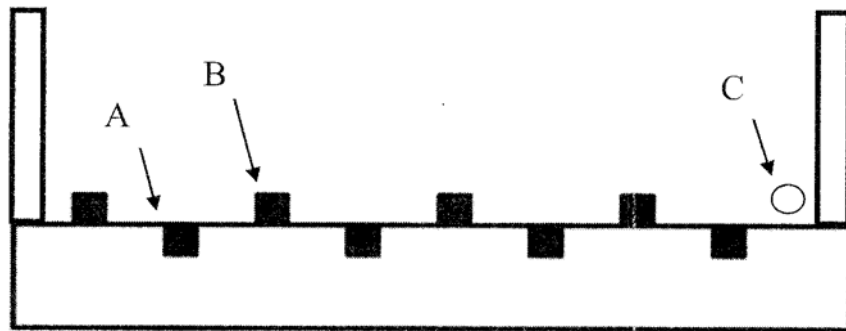


图 10B

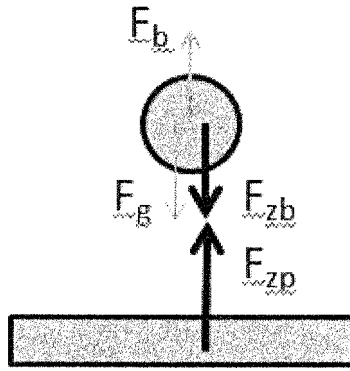


图 11A

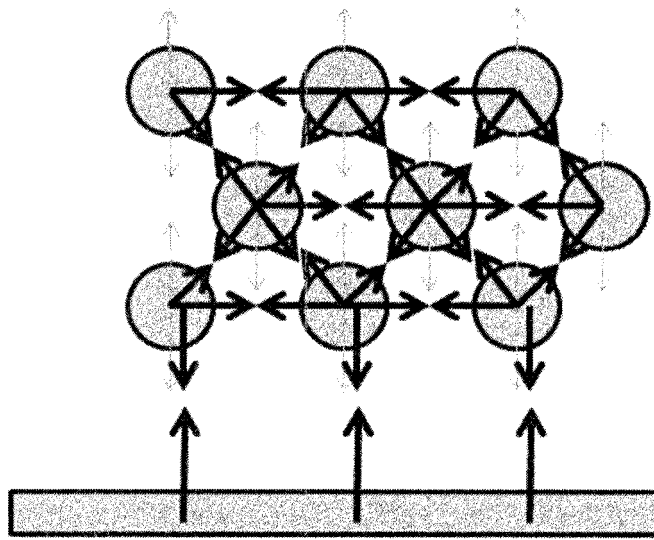


图 11B

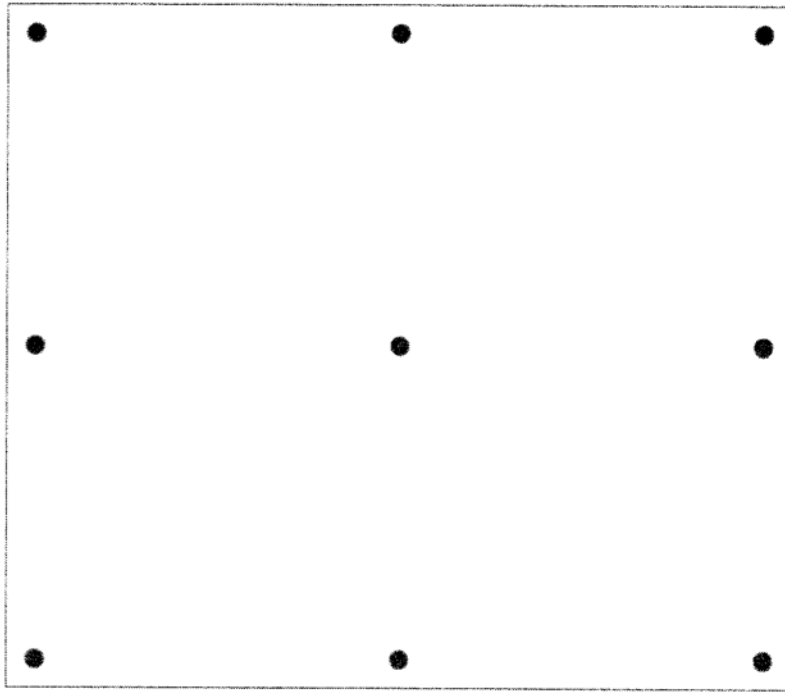


图 12

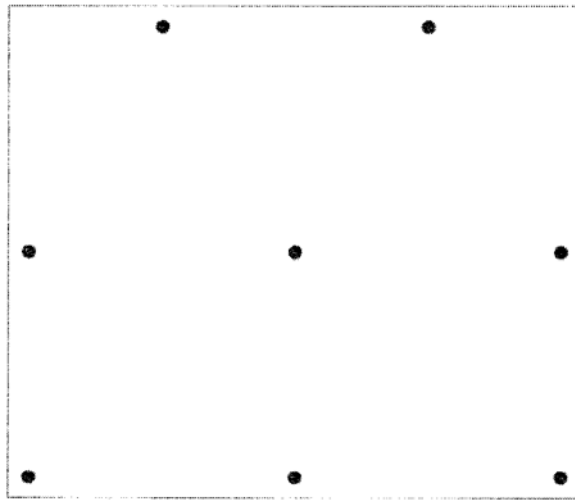


图 13A

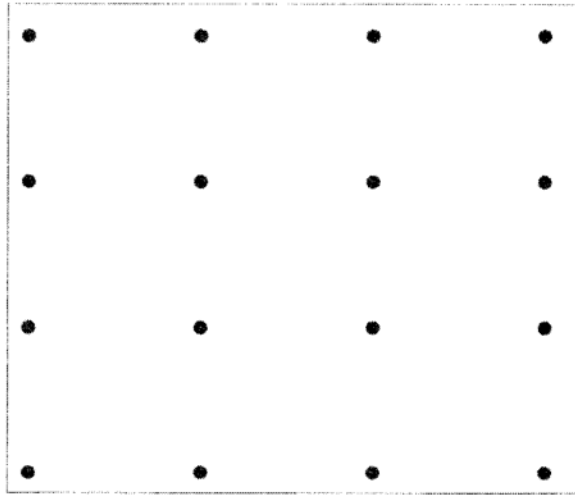


图 13B

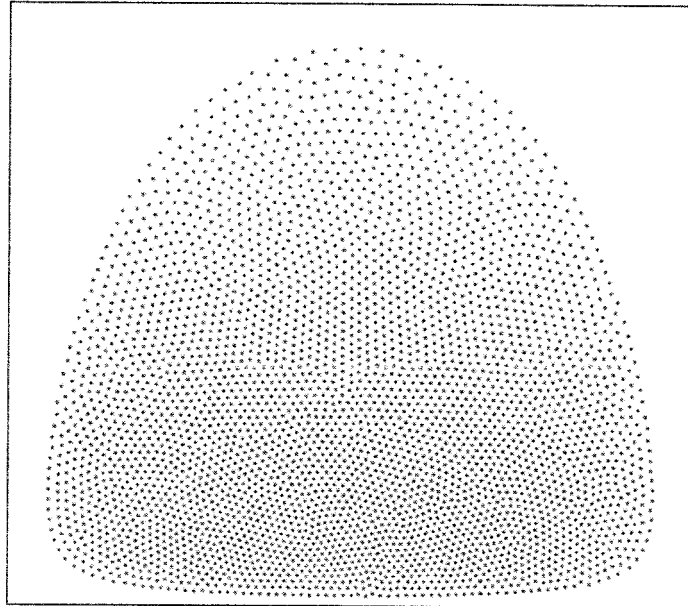


图 14

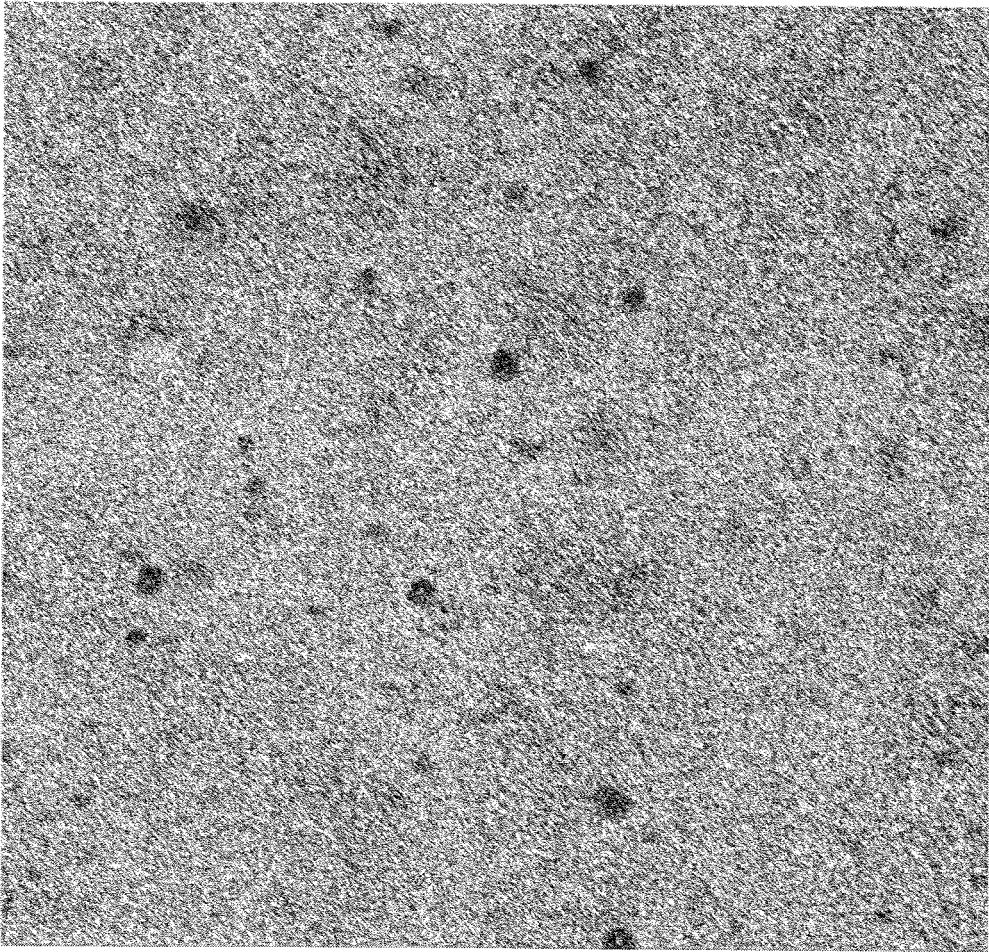


图 15

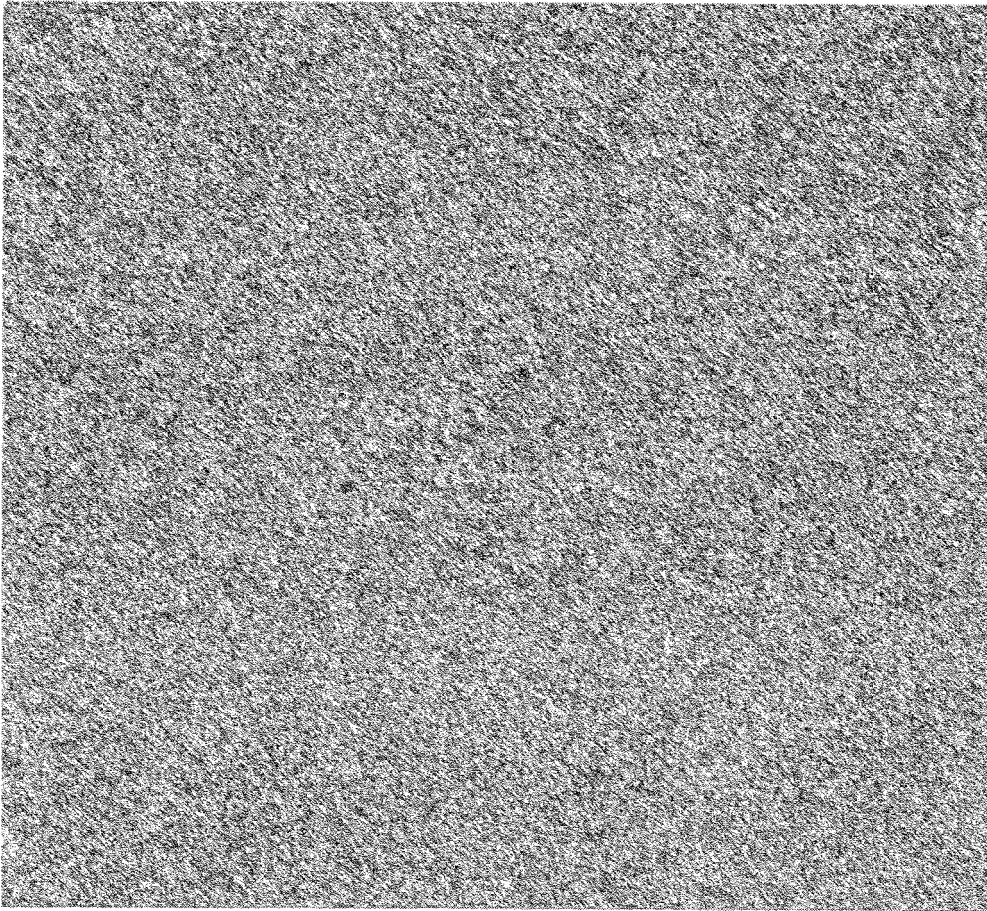


图 16

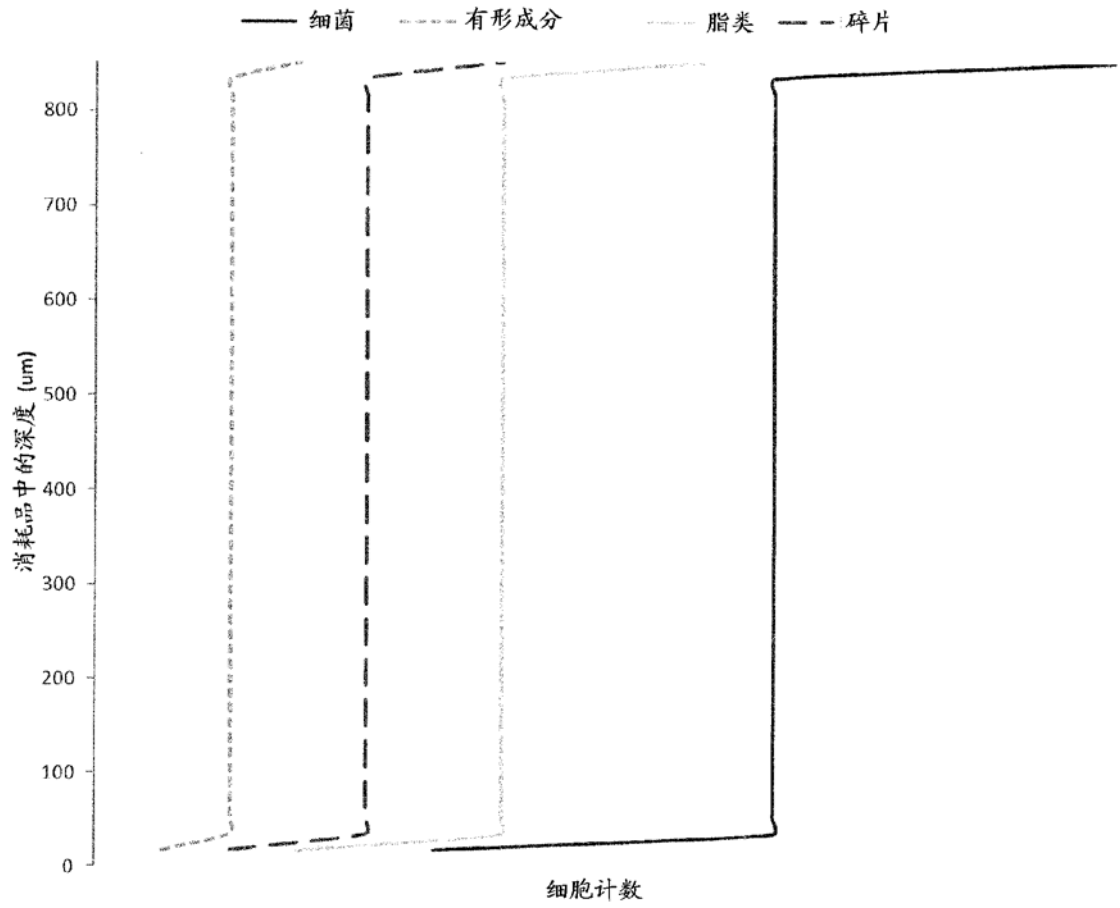


图 17A

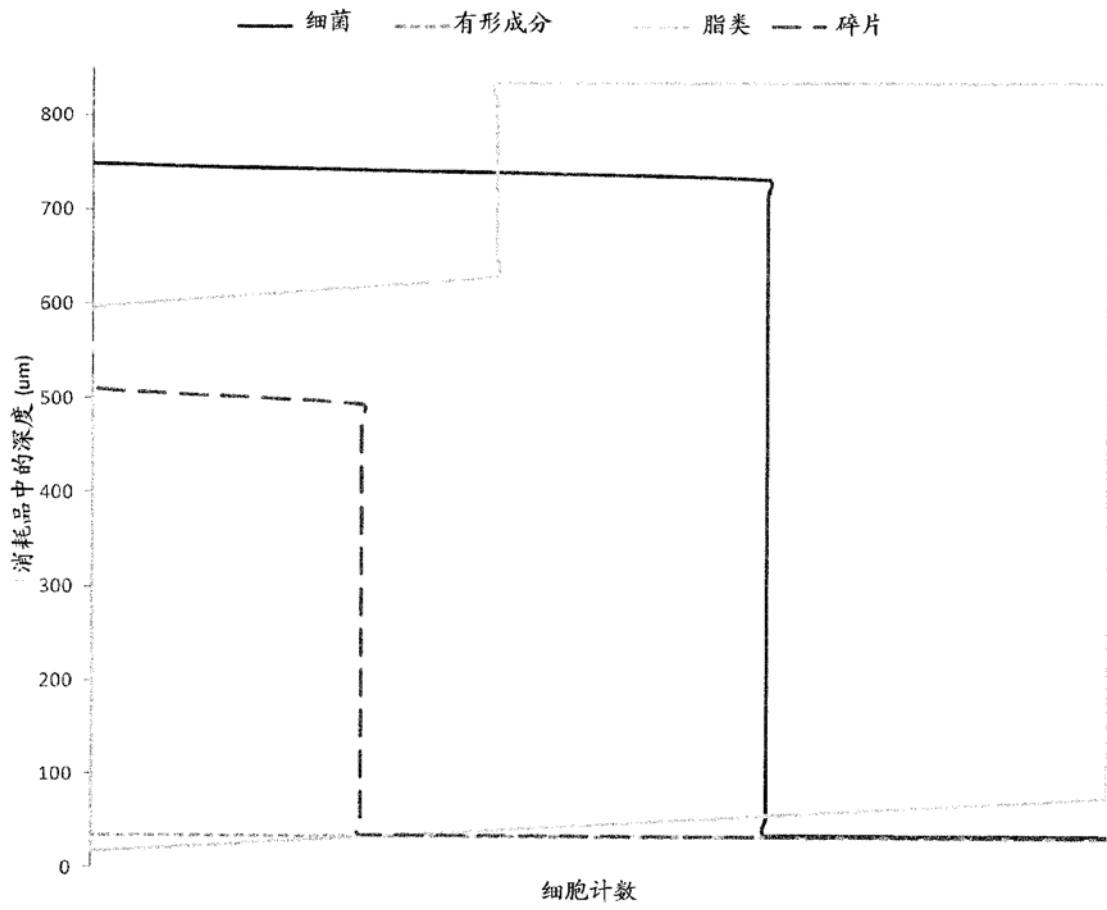


图 17B

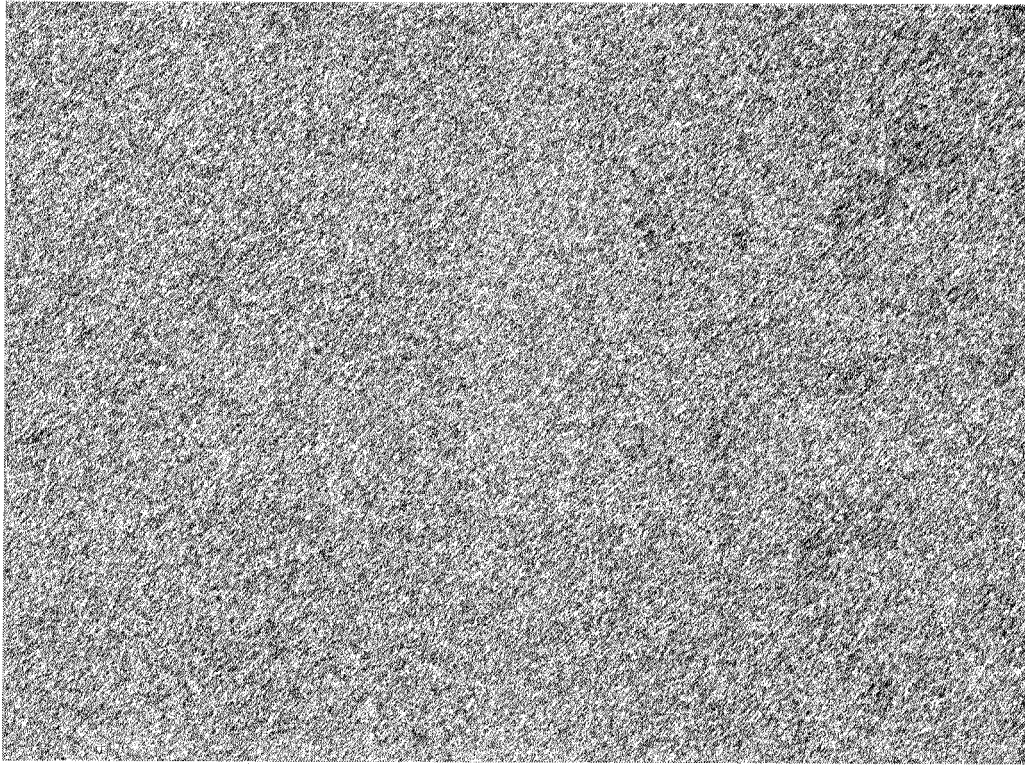


图 18A



图 18B



图 19A

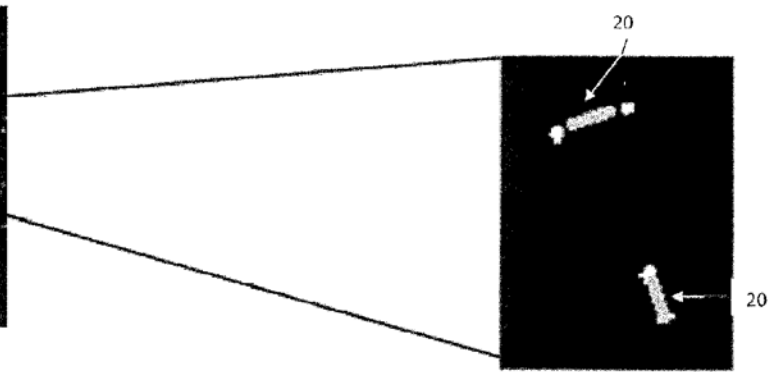
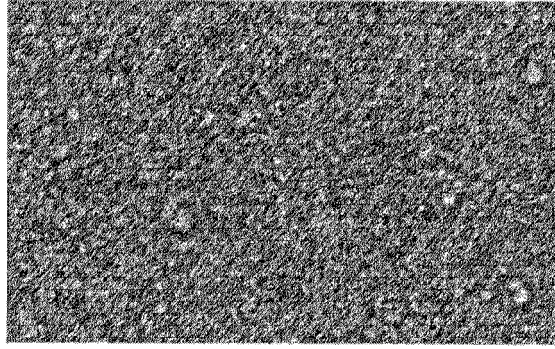


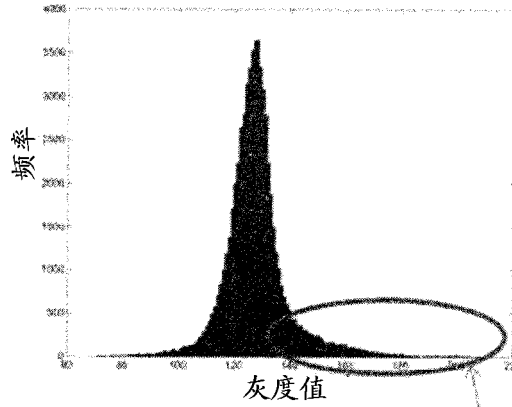
图 19B

较亮物体

样品图像(滤过的)



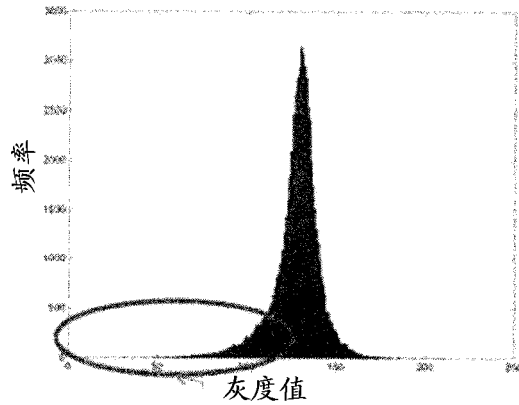
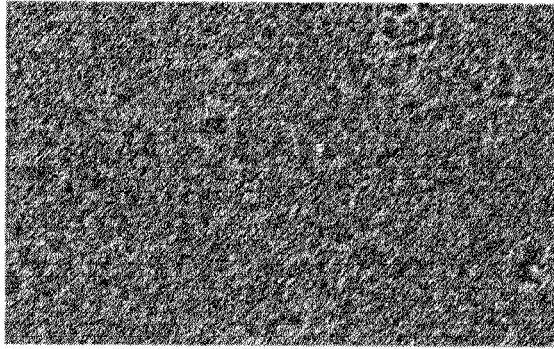
直方图



长向上尾巴(较亮)

图 20A

较暗物体



灰度值

长向下尾巴(较暗)

图 20B

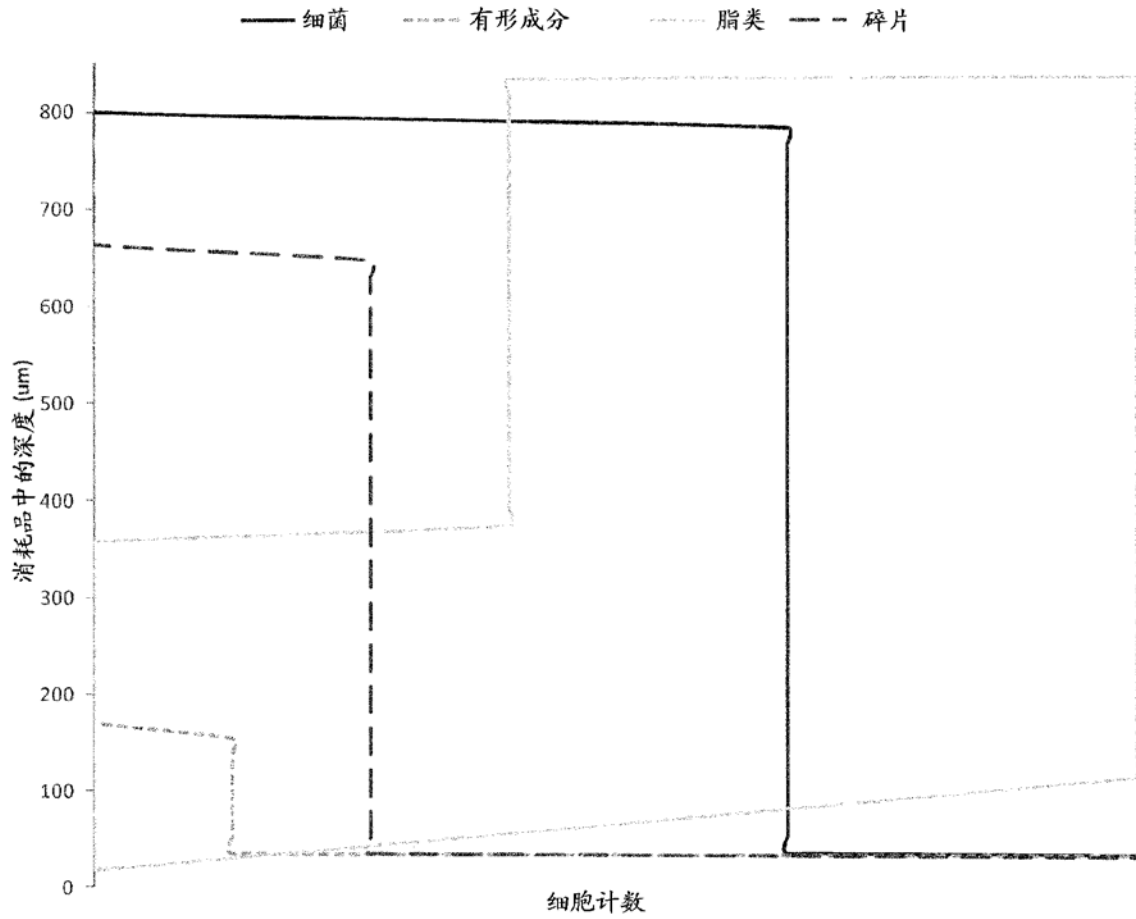


图 21

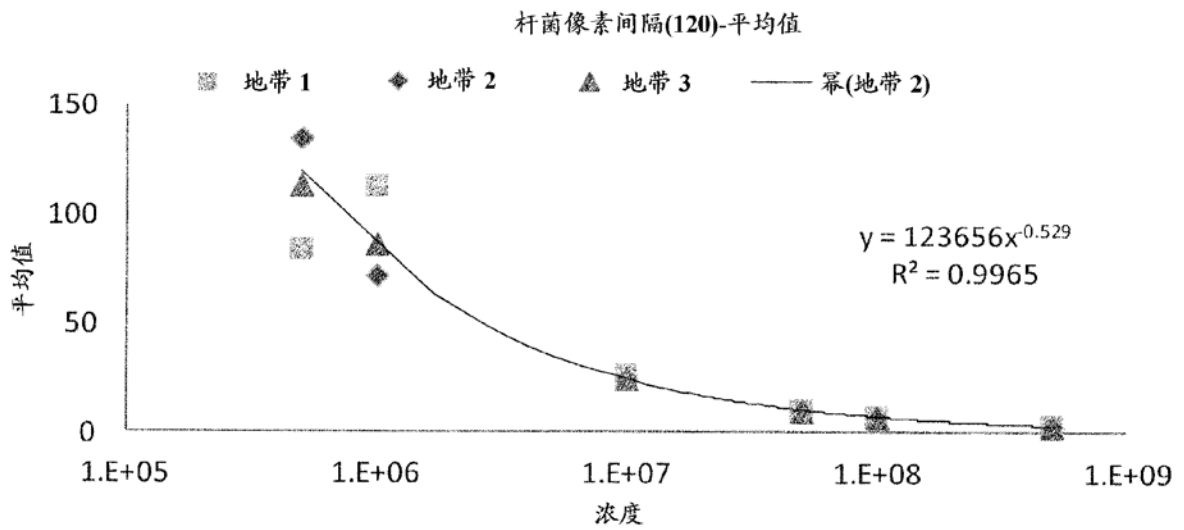


图 22A

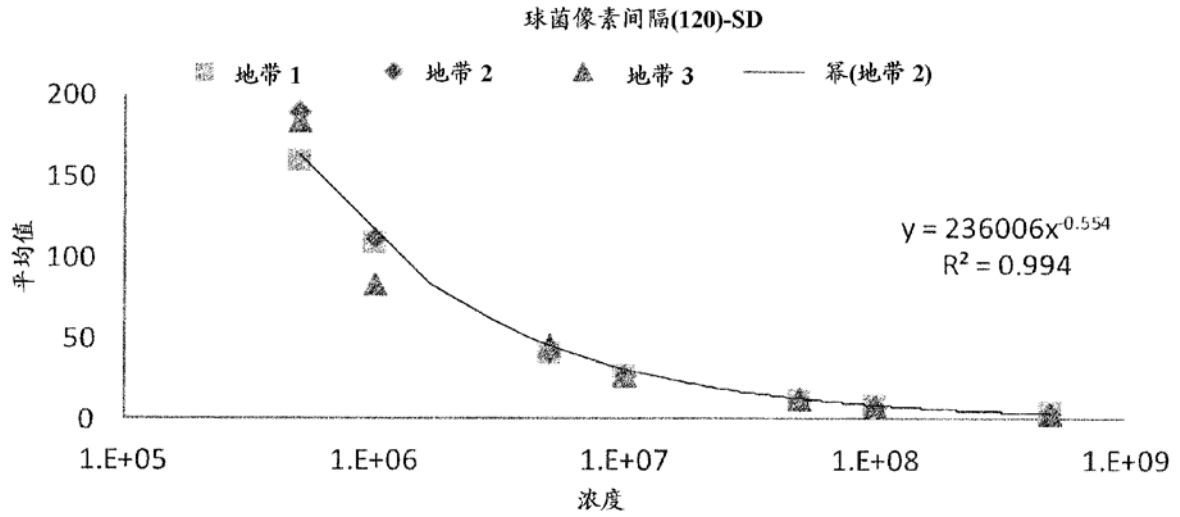


图 22B

Opti 和 V7 消耗品, 每一在 4 种仪器上

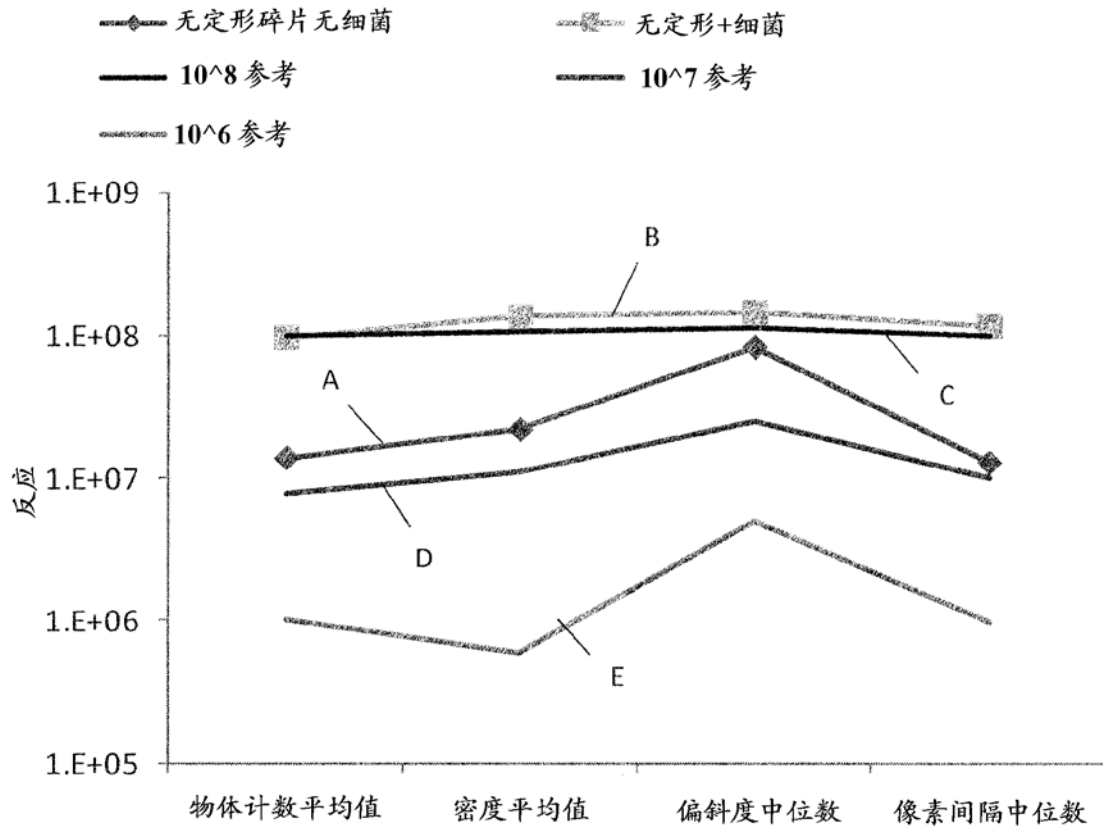


图 23A

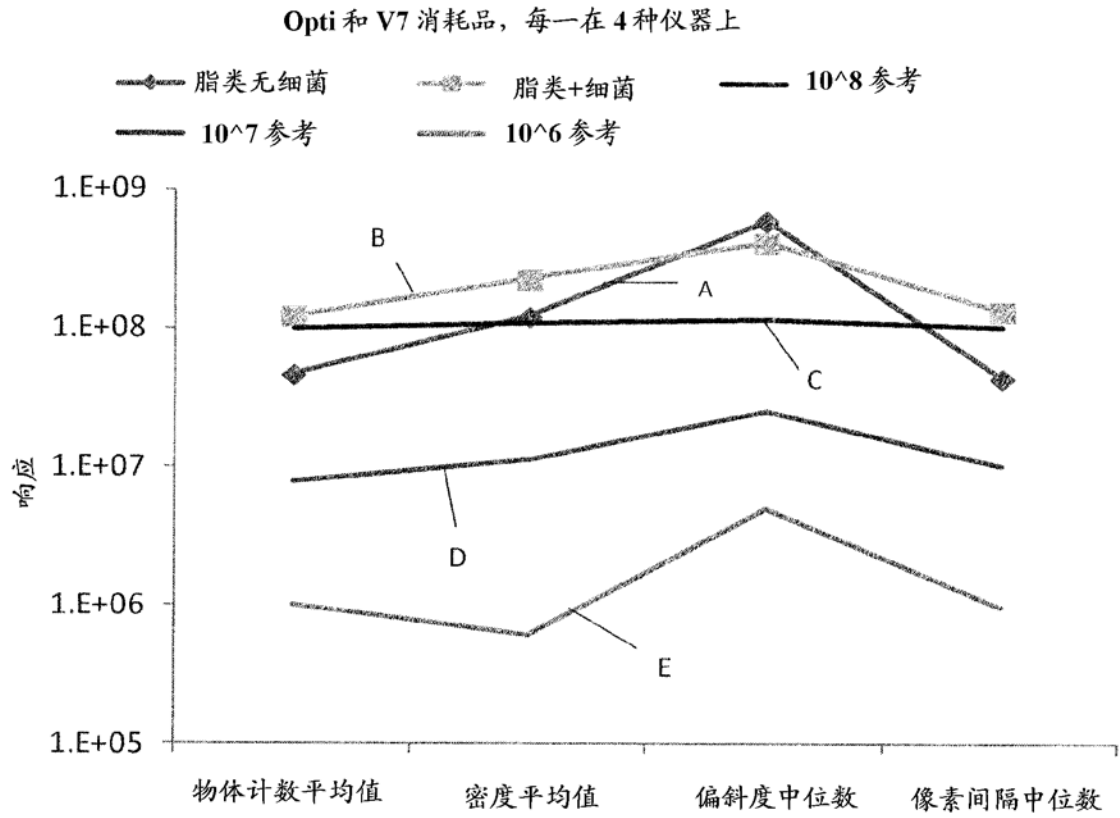


图 23B

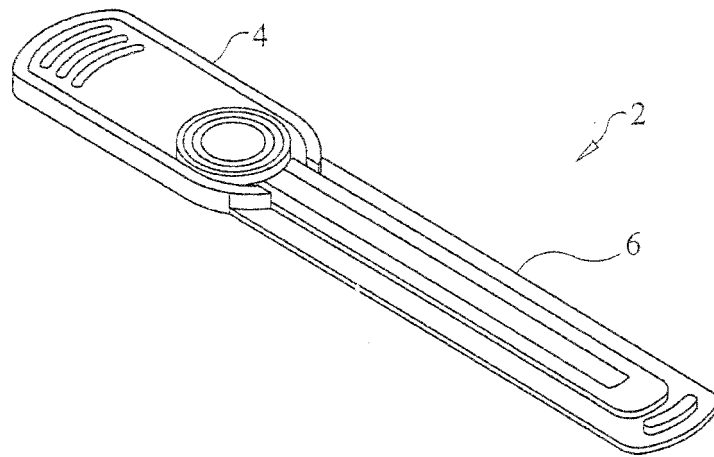


图 24

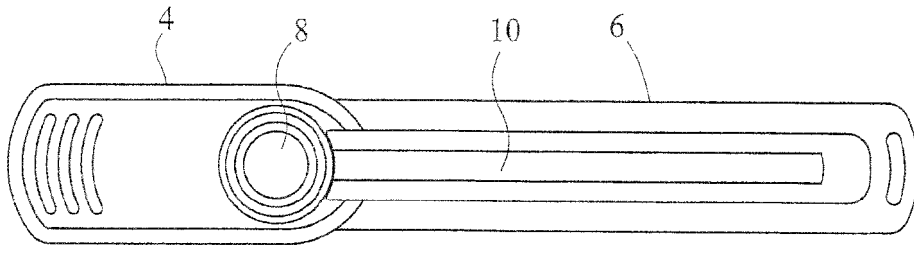


图 25

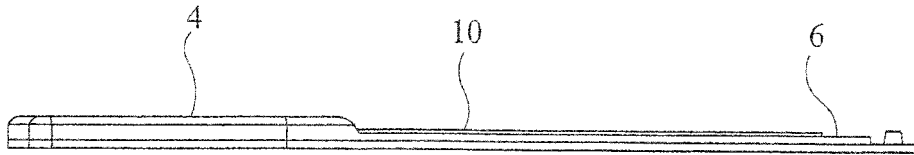


图 26

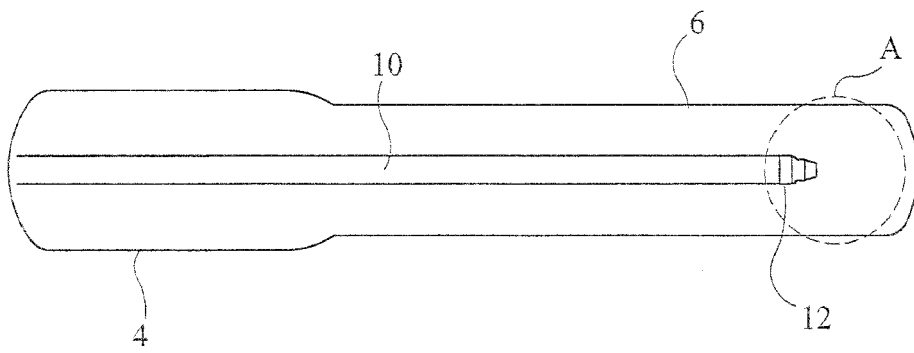


图 27

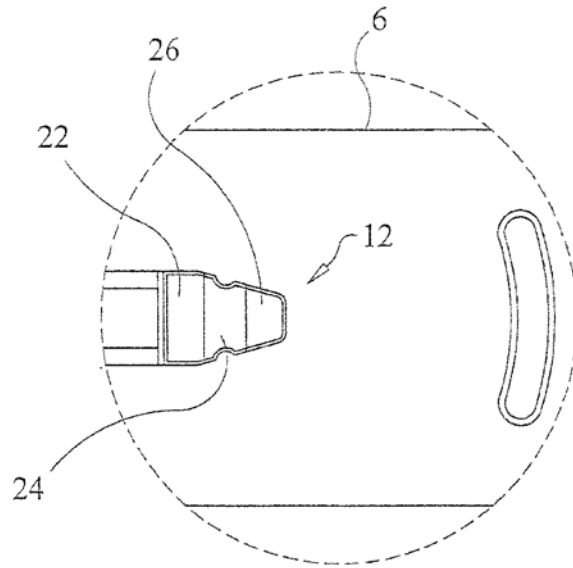


图 28