



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 001 259 T2 2007.05.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 466 985 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/04 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 001 259.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 008 637.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **08.04.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.05.2007**

(30) Unionspriorität:
2003106569 10.04.2003 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE, DE, GB, IT

(73) Patentinhaber:
Sysmex Corp., Kobe, JP

(72) Erfinder:
Kawashima, Yasuyuki, Kobe-shi Hyogo 655-0003, JP

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITL, 81925 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtungen zur Messung von Bakterien, und computerlesbares Speichermedium zur Speicherung von Rechnerprogrammen zur Bakterienanalyse**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen, Verfahren und Programme zum automatischen Nachweis von Bakterien in einer Probe und genauer gesagt Vorrichtungen, Verfahren und Programme für den automatischen Nachweis von Bacillus- oder Coccus-Bakterien in einer Probe.

Hintergrund

[0002] Nachweis von Bakterien, die in einer Probe enthalten sind und Bestimmung der Art der Bakterien werden häufig bei klinischen Untersuchungen und Nahrungsmittelhygiene-Untersuchungen durchgeführt. Die Arten von Bakterien werden üblicherweise klassifiziert in Bezug auf die Gram-Färbbarkeit der Bakterien (z.B. Gram-positive oder Gram-negative), und in Bezug auf die Form (z.B. Bacillus oder Coccus). Gram-negative Bacillus und Gram-positive Coccus rufen häufig negative Effekte auf den menschlichen Körper hervor.

[0003] Die Agarkulturmethode ist das häufigste Verfahren zur Klassifizierung von Bakterien. Dieses Verfahren beinhaltet das Kultivieren einer Probe auf einem Agarmedium für eine vorherbestimmte Zeit, optionales Färben der in der Kultur gebildeten Kolonien und Klassifikation der Bakterien durch einen Beobachter unter Verwendung eines Mikroskops. Die Agarkulturmethode ist jedoch ein schwieriges Verfahren insofern als es im wesentlichen ein manuelles Verfahren ist. Des weiteren vergeht eine erhebliche Zeit, bevor die Art des Bakteriums bestimmt werden kann, da die Kultivierung nötig ist.

[0004] In den vergangenen Jahren sind Verfahren versucht worden, welche unter Verwendung eines Teilchenanalysiergeräts, wie einem Durchflusszytometer oder dergleichen automatisch Bakterien messen. Diese Technologie umfasst die folgenden Aspekte: (1) ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Messung von Mikroorganismen, welche jeweils Vorkultur- und Nachkulturproben messen, um Messfehler infolge von Unreinheiten in der Probe zu vermeiden durch die Bestimmung des Unterschieds zwischen den beiden Messergebnissen (siehe z.B. US-Patent 6,165,740); und (2) ein Verfahren zum Zählen von Bakterien in Proben, enthaltend Unreinheiten, welches die Bakterien von den Unreinheiten trennt, die Bakterien zählt durch Hinzufügen eines kationischen Tensids zu der die Bakterien enthaltenden Probe, um die Farbstoff-Durchlässigkeit der Bakterien zu erhöhen und Färben der Bakterien infolge der Wirkung des Farbstoffs (siehe z.B. EP 1 136 563 A2).

[0005] Die Messung kann in einer relativen kurzen Zeit bewerkstelligt werden, wenn das Verfahren die Bakterien automatisch mittels eines Teilchenmessapparats, wie einem Durchflusszytometer oder dergleichen, misst. Unter solchen Verfahren ist jedoch noch keine Technik vorgeschlagen worden zur Unterscheidung von Bacillus und Coccus mit einer hohen Genauigkeit.

Zusammenfassung

[0006] Das Ausmaß der vorliegenden Erfindung wird einzig durch die beigefügten Ansprüche definiert und wird in keiner Weise beeinflusst durch die Aussagen innerhalb dieser Zusammenfassung.

[0007] Ein Verfahren zur Messung von Bakterien, welches Merkmale der vorliegenden Erfindung darstellt, umfasst

- (a) Fluoreszenzfärben von Bakterien in einer Probe;
- (b) Detektieren von Größeninformation der Bakterien in der Probe, und Fluoreszenzinformation, welche die Intensität des von den Bakterien ausgestrahlten Fluoreszenzlichts darstellt;
- (c) Herstellen eines Scattergrams, welches eine Verteilung der Bakterien auf Basis der detektierten Größeninformation und Fluoreszenzinformation darstellt; (d) Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram; und
- (e) Bestimmen, ob die Bakterien in der Form Bacillus oder Coccus sind auf Basis des Analyseergebnisses.

[0008] Eine Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, umfasst: (a) eine Probenvorrichtung zur Bereitstellung einer Probe, enthaltend Fluoreszenz-gefärbte Bakterien, (b) einen ersten Detektor zum Detektieren von Größeninformation jedes Bakteriums in der Probe; (c) einen zweiten Detektor zum Nachweis von Fluoreszenzinformation, die die Intensität des von jedem Bakterium in der Probe ausgestrahlten Fluoreszenzlichts ausdrückt; und (d) eine Kontrolleinheit, die konfiguriert ist, zum Herstellen eines Scattergrams der Bakterien unter Verwendung der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation als Parameter, zum Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram und zur Bestimmung, ob die Bak-

terien in der Probe Bacillus oder Coccus sind auf Basis eines Analyseergebnisses.

[0009] Ein Computer-ausführbares Programm zur Analyse von Bakterien, welches Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, umfasst: (a) Erhalten von Größeninformation von Bakterien und Fluoreszenzinformation, welche die Intensität des von den Bakterien ausgestrahlten Fluoreszenzlichts darstellt; (b) Herstellen eines Scattergrams, welches eine Verteilung der Bakterien auf Basis der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation darstellt; (c) Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram; und (d) Bestimmen, ob die Bakterien Bacillus oder Coccus sind auf Basis eines Analyseergebnisses.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0010] [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Ansicht einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0011] [Fig. 2](#) ist eine perspektivische Ansicht der Probenvorbereitungseinheit einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0012] [Fig. 3](#) ist eine Illustration des optischen Systems und Flusssystems der Nachweiseinheit einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0013] [Fig. 4](#) ist ein Blockdiagramm der Analysekontrolleinheit einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0014] [Fig. 5](#) ist ein Flussdiagramm, welches die allgemeine Kontrolle einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, darstellt.

[0015] [Fig. 6](#) ist ein Flussdiagramm, das das Arbeiten einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, darstellt.

[0016] [Fig. 7](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0017] [Fig. 8](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0018] [Fig. 9](#) illustriert den Einheitsvektor, der in dem Analyseverfahren verwendet wird, welches durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, durchgeführt wird.

[0019] [Fig. 10](#) zeigt ein Beispiel einer Bildschirmoberfläche, welche von einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, angezeigt wird.

[0020] [Fig. 11](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0021] [Fig. 12](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0022] [Fig. 13](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0023] [Fig. 14](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0024] [Fig. 15](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0025] [Fig. 16](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0026] [Fig. 17](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, hergestellt durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0027] [Fig. 18](#) ist ein Flussdiagramm des Arbeitens einer automatisierten Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert.

[0028] [Fig. 19](#) zeigt ein Beispiel einer Bildschirmoberfläche, die durch eine automatisierte Bakterienmessvorrichtung, die Merkmale der vorliegenden Erfindung verkörpert, angezeigt wird.

Detaillierte Beschreibung

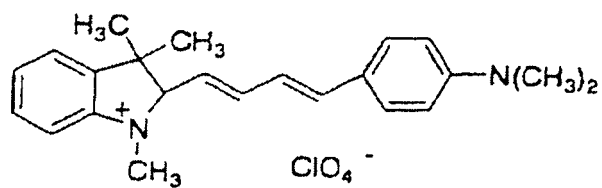
[0029] Die vorliegende Erfindung stellt Techniken, Vorrichtungen und Computer-lesbare Programme zur Verfügung zum schnellen und genauen Bestimmung, ob die Art von Bakterien in einer Probe Bacillus oder Coccus ist.

[0030] Die Verfahren zum Messen von Bakterien gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen (a) Herstellen einer Probe durch Fluoreszenzfärben der Bakterien in einem Probe; (b) Detektieren von Größeninformation der Bakterien und Fluoreszenzinformation, welche die Intensität von Fluoreszenzlicht, das von den Bakterien jeder Art in einer hergestellten Probe ausgestrahlt wird, ausdrückt; (c) Erzeugen eines Scattergrams unter Verwendung der detektierten Größeninformation und Fluoreszenzinformation als Parameter; (d) Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram; und (e) Bestimmen, ob die Art der Bakterien in der Probe Bacillus oder Coccus ist, auf Basis des Analyseergebnisses.

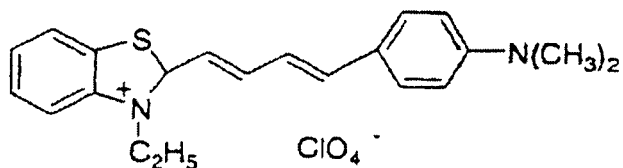
[0031] Ein Fluoreszenzfarbstoff zum Binden an Bestandteile der Bakterien und Ausstrahlen von Fluoreszenzlicht wird in dem Bakterienfluoreszenzfärbemittel verwendet. Zum Beispiel können ausschließlich Bakterien in einer Probe gefärbt werden unter Verwendung eines Farbstoffs zum Färben von Nucleinsäure, welcher ausschließlich an intrazelluläre DNA oder RNA der Bakterien bindet. Zum Beispiel können Polymethin-Farbstoffe mit den Strukturen (1) bis (11) unten verwendet werden:

(1) Thiazolorange

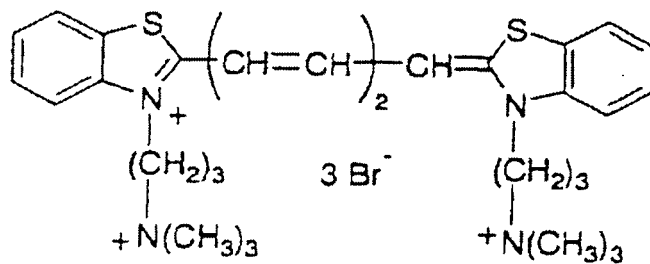
(2)



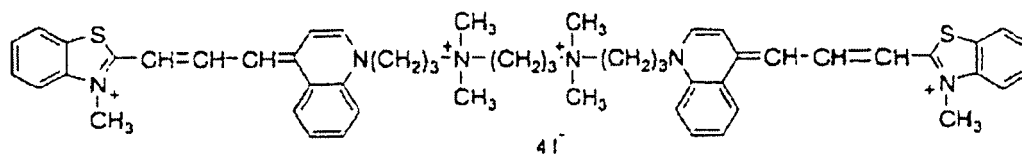
(3)



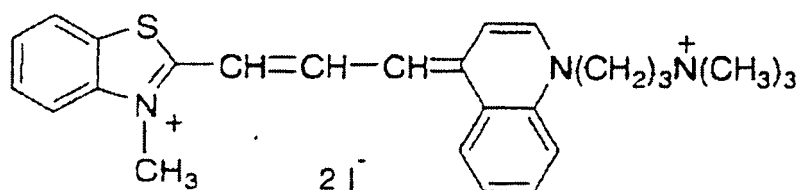
(4)



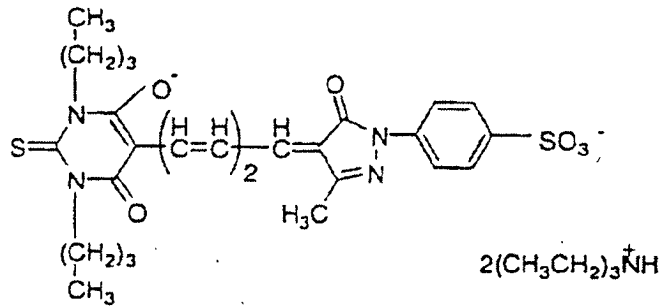
(5)



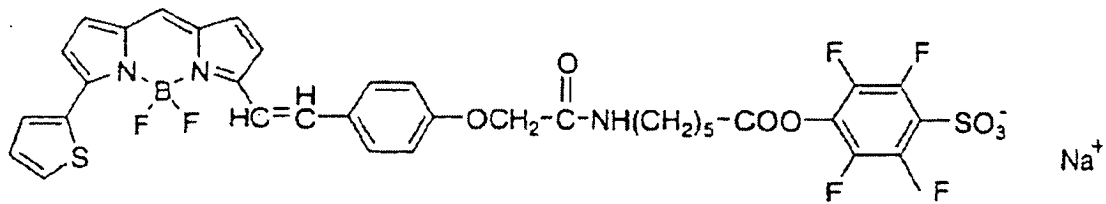
(6)



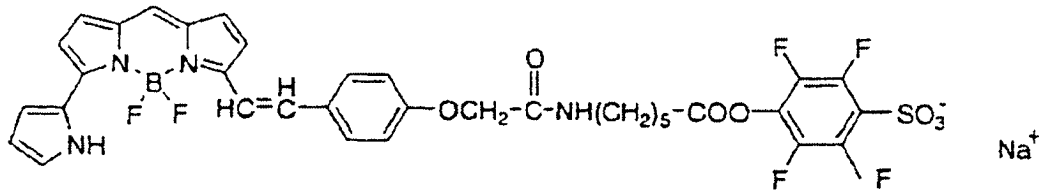
(7)



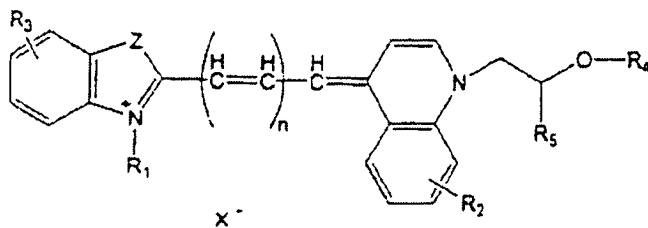
(8)



(9)

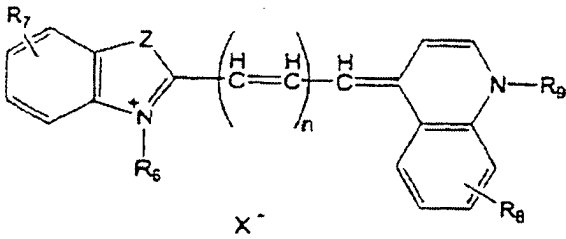


(10) Verbindungen mit der allgemeinen Formel:



worin R_1 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen dargestellt; R_2 und R_3 Wasserstoffatome, Alkylgruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatome oder Alkoxygruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen darstellen, R_4 eine Wasserstoffgruppe, Acylgruppe oder Alkylgruppe mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen darstellt; R_5 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, welche optional substituiert sein können, darstellt; Z ein Schwefelatom, Sauerstoffatom oder Kohlenstoffatom, substituiert mit zwei Alkylgruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, darstellt; n 1 oder 2 ist; und X ein Anion darstellt.

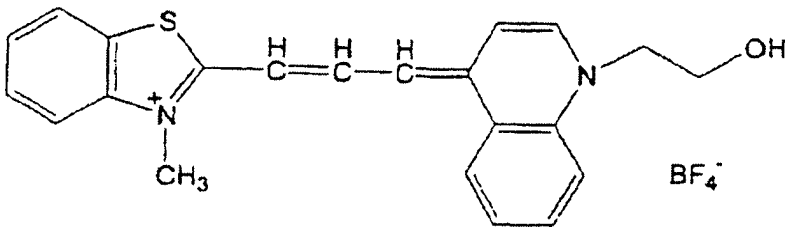
[0032] (11) Verbindungen mit der allgemeinen Formel:



worin R_6 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 18 Kohlenstoffatomen darstellt; R_7 und R_8 Wasseratome, Alkylgruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen oder Alkoxygruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen darstellt; R_9 ein Wasserstoffatom, Acylgruppe oder Alkylgruppe mit 1 bis 18 Kohlenstoffatomen darstellt; Z ein Schwefelatom, Sauerstoffatom oder Kohlenstoffatom, substituiert mit 2 Alkylgruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen darstellt; n 0, 1 oder 2 ist; und X ein Anion darstellt.

[0033] Unter diesen Farbstoffen ist (1) kommerziell erhältlich, (2) und (3) sind erhältlich von Japan Photosensitive Dye Research Center, und (5) bis (9) sind erhältlich von Molecular Probes, Inc. Farbstoff (10) kann hergestellt werden durch das im US-Patent 5,821,127 beschriebene Verfahren. Farbstoff (11) kann hergestellt werden durch das im US-Patent Nr. 6,004,816 offenbarte Verfahren.

[0034] Unter den durch die allgemeine Formel (10) dargestellten Farbstoffen ist derzeit der unten gezeigte Farbstoff besonders wünschenswert:



[0035] Bakterien mit einem spezifischen Niveau an Fluoreszenzintensität können unterschieden werden von Unreinheiten, welche im wesentlichen keine Fluoreszenzintensität aufweisen, falls Fluoreszenzinformation (Fluoreszenzintensität) von jedem Teilchen in einer Probe nachgewiesen wird, die einem Fluoreszenzfärbungsverfahren unterworfen worden war unter Verwendung der oben genannten Fluoreszenzfarbstoffe.

[0036] Auf elektrischem Widerstand basierende Verfahren, welche einen Detektor verwenden, mit einem Element, enthaltend eine Pore zum Hindurchtreten der Bakterien und erste und zweite Elektroden, detektieren die Größe von Teilchen anhand der Veränderung des elektrischen Widerstands einer Probe über die Zeit, wenn die vorbereitete Probe durch die Pore hindurchtritt. Diese Verfahren können verwendet werden zum Nachweis der Teilchengrößeninformation. Verfahren, welche gestreute Lichtpulseweite oder gestreute Lichtintensität, die von den Teilchen ausgestrahlt werden, detektieren unter Verwendung eines Durchflusszytometers, können auch verwendet werden zur Detektion von Teilchengrößeninformation. In diesen Verfahren umfasst Teilchengrößeninformation Information, die den Teilchendurchmesser widerspiegelt, die Breite der Teilchen in einer Richtung im rechten Winkel zum Teilchendurchmesser, Teilchenvolumen oder dergleichen. Der Wert der Veränderung des elektrischen Widerstands, der durch das elektrische Widerstandsverfahren nachgewiesen wird und die Pulsweite und Intensität des gestreuten Lichtsignals, das durch das Durchflusszytometerverfahren detektiert wird, können verwendet werden als die Größeninformation.

[0037] Durchflusszytometrische Verfahren zur Detektion der Intensität von Fluoreszenzlicht, das von Fluoreszenz-gefärbten Teilchen ausgestrahlt wird, kann verwendet werden als das Verfahren zum Nachweis von Fluoreszenzinformation.

[0038] Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, in welchem Laserlicht verwendet wird, um eine fließende Probenflüssigkeit, welche Zielteilchen, wie Bakterien und Zellen enthält, zu bestrahlen. Optische Information, betreffend gestreutes Licht und Fluoreszenzlicht, welches generiert wird, wenn die Teilchen durch die vom Laserlicht bestrahlte Region hindurchtreten, wird detektiert. Anschließend werden die Teilchen analysiert auf Basis dieser detektierten optischen Information. Die verschiedene optische Information wird detektiert als pulsartige elektrische Signale durch fotoelektrische Umwandlungselemente, wie Fotodioden, Fotoverstärkerröhren und dergleichen. Unter Verwendung dieser Signale kann die Signalintensität erhalten werden, basiert auf der Höhe der Pulsspitze, und die Lichtemissionszeit kann erhalten werden auf Basis der Pulsbreite. Im allgemeinen spiegelt das vorwärts gestreute Lichtsignal die Größe der Teilchen wider und das Fluoreszenzlichtsignal spiegelt

den Grad der Färbung der Teilchen, welche zuvor Fluoreszenz-gefärbt worden waren, wider.

[0039] Ein Scattergramm ist zusammengesetzt aus Punkten, die zu individuellen Teilchen korrespondieren, basierend auf einer Vielzahl von Teilcheninformation, detektiert von jedem Teilchen in einem Koordinatensystem, dessen Achsen eine Vielzahl von Informationsarten darstellen (z.B. Größeninformation, die die Größe der Teilchen darstellt, und Fluoreszenzlichtinformation), welche die Charakteristika der Teilchen widerspiegeln. Wenn die Teilcheneigenschaften sich unterscheiden, treten Unterschiede in der Verteilung der Punkte auf dem Scattergramm auf. Die gegenwärtigen Erfinder haben entdeckt, dass, wenn Bacillus enthaltende Proben und Coccus enthaltende Proben verglichen wurden, die Größeninformation der beiden im wesentlichen gleich sind, aber dass die erhaltene Fluoreszenzlichtinformation dazu tendiert, größer zu sein für Bacillus als für Coccus, woraus sich Unterschiede in der Punktverteilung im Scattergramm ergeben. Somit basiert gemäß der vorliegenden Erfindung die Bestimmung, ob Bakterien einer Probe Bacillus oder Coccus sind, auf Unterschieden in dieser Verteilung.

[0040] Unterschiede in der Verteilung von Punkten in einer Bacillusprobe und Coccusprobe werden ausgedrückt in der Steigung der Verteilungen. Diese Steigungen der Verteilungen werden unten beschrieben. [Fig. 7](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, erhalten von einer Probe, enthaltend Bacillus, und [Fig. 8](#) zeigt ein Beispiel eines Scattergrams, erhalten von einer Probe, enthaltend Coccus, worin die Fluoreszenzintensität (FL) auf der X-Achse aufgetragen ist, und die vorwärts gestreute Lichtintensität (Fsc) auf der Y-Achse aufgetragen ist. Der Bereich BCT in den Abbildungen wird als der Bereich angesehen, in welchem Punkte, die Bakterien entsprechen, auftreten. Die Population von Punkten in den Scattergrammen, die zu Bakterien in den Scattergrammen korrespondiert, ist so verteilt, dass sie sich in einer festgelegten Richtung ausbreitet (von unten links nach oben rechts).

[0041] In dem Koordinatensystem des Scattergrams ist die Steigung mit dieser "festgelegten Richtung" die Steigung der Verteilung. Wenn [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) verglichen werden, ist die Steigung in Bezug auf die X-Achse in die Richtung, in welcher die Population sich gegen oben rechts hin erstreckt (d.h. die Steigung der Verteilung) größer in der Coccus-enthaltenden Probe ([Fig. 8](#)) als in der Bacillus-enthaltenden Probe ([Fig. 7](#)). Aufgrund dieser Tatsache, kann auf Basis der Steigung der Verteilung gemäß der vorliegenden Erfindung eine Bestimmung unternommen werden, ob Bakterien in einer Probe Bacillus oder Coccus sind. Die Steigung der Verteilung wird bestimmt in der Richtung der maximalen Varianz der Punkte, welche die Bakterien darstellen, und die Steigung der Verteilung kann bestimmt werden durch Bestimmung der Steigung in der Richtung der maximalen Varianz. Eine Steigung einer Näherungsgleichung, berechnet aus den Punkten, die Bakterien darstellen, kann auch als die Steigung der Verteilung verwendet werden.

[0042] Eine Ausführungsform der automatisierten Bakterienmessvorrichtung der vorliegenden Erfindung wird nachstehend beschrieben. In [Fig. 1](#) wird eine äußere Ansicht eines automatisierten Bakterienmessapparats **1** durch die durchgezogenen Striche angezeigt, und die innere Struktur wird kurz angedeutet durch die gestrichelten Linien. Die am weitesten vorne liegende Oberfläche der Vorrichtung ist ausgestattet mit dem Flüssigkristall-Touchpanel **11** zum Eingeben verschiedener Arten von Einstellungen und dem Ausgeben von Messergebnissen, der Probenabdeckung **12**, Reagensabdeckung **13** und dem Startknopf **14**. Wenn die Probenabdeckung **12** geöffnet wird, kann eine Probe in die Probenhalteeinheit, welche innerhalb der Vorrichtung zur Verfügung gestellt wird, eingesetzt werden. Wenn die Reagensabdeckung **13** geöffnet wird, kann Reagens in die Reagenshalteeinheit, welche innerhalb des Apparats zur Verfügung gestellt wird, eingesetzt werden. Die Probenhalteeinheit und die Reagenshalteeinheit werden nachstehend weiter beschrieben.

[0043] In den durch die gestrichelten Linien angedeuteten inneren Strukturen der Vorrichtung beherbergt der obere Teil eine Analysekontrolleinheit **400**, welche einen Mikrocomputer und verschiedene Arten von Schaltungen und dergleichen umfasst. Der untere Teil der am nächsten zur Vorderseite ist, beherbergt eine Probenbereitungseinheit **200** zur Bereitung von Probenflüssigkeiten. Der untere Teil an der Hinterseite beherbergt eine Detektionseinheit **300** zum Detektieren von Signalen der Bakterien in der Probenflüssigkeit.

Probenbereitungseinheit

[0044] [Fig. 2](#) zeigt die Probenbereitungseinheit **200** der automatisierten Bakterienmeseinrichtung **1**. Die Probenbereitungseinheit **200** ist ausgestattet mit einer Probenhalteeinheit **201**, Reagenshalteeinheit **202**, einem Inkubator **204** als eine Reaktionseinheit und einen Verteiler **205**. Ein Gefäß **201a** für das Aufnehmen einer Probe wird in der Probenhalteeinheit **201** platziert. In der automatisierten Bakterienmessvorrichtung **1** werden eine Verdünnungsflüssigkeit und eine Färbeflüssigkeit als Messreagenzien verwendet, und ein Gefäß **202a**, welches eine Verdünnungsflüssigkeit beherbergt und ein Gefäß **202b**, welches eine Färbeflüssigkeit beherbergt,

werden jeweils in die Reagenzienhalteinheit **202** eingesetzt. Ein Gefäß **204a** zum Reagieren der Probe und des Reagens wird in den Inkubator **204** platziert. Ein Verteiler **205** ist vertikal, vor und zurück und von Seite zu Seite bewegbar über eine Antriebseinrichtung, und saugt eine bestimmte Menge an Flüssigkeit an, bzw. stößt eine bestimmte Menge an Flüssigkeit aus. Der Verteiler **205** saugt jeweils vorbestimmte Mengen einer Probe in dem Probengefäß **201a**, welches in die Probenhalteinheit **201** eingesetzt ist, und Verdünnungsflüssigkeit in dem Verdünnungsgefäß **202a** oder Färbeflüssigkeit in dem Gefäß **202b**, welche in die Reagenzhalteinheit **202** eingesetzt sind, an. Der Verteiler **205** stößt die Flüssigkeit in das Gefäß **204a** aus, welches in den Inkubator **204** eingesetzt ist. Der Inkubator **204** behält eine vorherbestimmte Temperatur bei und reagiert die Probe und das Reagens um eine Probe vorzubereiten. Aus der vorbereiteten Probe wird durch den Dispenser **205** eine Probe entnommen und zu dem Probengefäß **112** gebracht. Details des Funktionierens der Probenvorbereitungseinheit **200** werden weiter unten beschrieben.

Detektionseinheit

[0045] **Fig. 3** illustriert das optische System und Durchflusssystem der Detektionseinheit **300**. Eine Umhüllungsflusszelle **107** wird verwendet für den Fluss der Probenflüssigkeit, welche von dem Probengefäß **112** der Probenvorbereitungseinheit **200** zur Verfügung gestellt wurde, und ist verbunden mit dem Probengefäß **112**. Des weiteren ist die Umhüllungsflusszelle **107** ausgestattet mit einer Düse **113**, welche Probenflüssigkeit zu einer Öffnung **111** ausstößt, einer Hüllflüssigkeitszufuhröffnung **110** und einer Abflussöffnung **114**. Nahe der Umhüllungsflusszelle **107** sind eine Laserlichtquelle **117** zum Bestrahlen einer Probenflüssigkeit, welche in der Umhüllungsflusszelle **107** fließt, mit einem Laserstrahl und verschiedene Arten von optischen Komponenten (Kondensierlinse **118**, Strahlstopper **119**, Sammellinse **120**, Abschirmplatte **130** mit einem Nadelloch **121**, ein dichroider Spiegel **122** und Filter **123**) zum Kondensieren des Fluoreszenzlichts und des vorwärts gestreuten Lichts, welches von den durch das Laserlicht bestrahlten Teilchen in der Probenflüssigkeit ausgestrahlt wird. Des weiteren wird eine Fotoverstärkerröhre **124** als eine Detektionsvorrichtung zum Detektieren des kondensierten Fluoreszenzlichts zur Verfügung gestellt und eine Fotodiode **125** wird zur Verfügung gestellt als Detektionsvorrichtung zum Detektieren von vorwärts gestreutem Licht.

[0046] Ein Umhüllungsflüssigkeitsgefäß **109**, welches durch die Druckpumpe **147** unter positiven Druck gesetzt wird, ist verbunden mit der Hüllflüssigkeitszufuhröffnung **110** durch ein Ventil **105**. Die Abflussöffnung **114** ist verbunden mit einer Abfallflüssigkeitskammer (nicht gezeigt). Die Düse **113** ist verbunden mit dem Probenaufnahmebehälter **112** durch ein Ventil **101** und an eine Pumpe **148**, welche negativen Druck erzeugt durch einen Flussweg **139** und ein Ventil **102**. Eine Spritzenpumpe **133** ist auf der Seite des Ventils **102** mit dem Flussweg **139** verbunden.

[0047] Die Detektionseinheit **300** der oben beschriebenen Struktur detektiert vorwärts gestreute Lichtsignale und Fluoreszenzlichtsignale von Teilchen der Bakterien und dergleichen, welche in einer Probe, welche in der Probenvorbereitungseinheit **200** vorbereitet wurde, enthalten sind, während diese durch die Umhüllungsflusszelle **107** fließt. Die detektierten Signale werden zu einer Analysekontrolleinheit **400** übermittelt. Die detaillierte Funktion der Detektionsvorrichtung **300** wird unten beschrieben.

Analysekontrolleinheit

[0048] **Fig. 4** ist ein Blockdiagramm, das die Struktur der Analysekontrolleinheit **400** zeigt. Die Analysekontrolleinheit **400** umfasst einen Computer, enthaltend eine CPU, RAM, ROM, Festplatte und dergleichen, und verschiedene Arten von Schaltungen und funktioniert als ein Informationsprozessor **134** und eine Steuerungsschaltung **137**. Wie in **Abb. 4** gezeigt, wird der Informationsprozessor **134** zur Verfügung gestellt mit einem Analyser **141**, Speicher **145** und Controller **146**, und der Analyser **141** wird zur Verfügung gestellt mit einem Scattergram-Generator **142**, einer Analyseeinheit **143** und einer Bestimmungseinheit **144**.

[0049] Der Speicher **145** speichert (a) Analyseprogramme zum Analysieren, über den Analyser **141**, der Signale, welche von den Teilchen in der Probenflüssigkeit durch die Detektionseinheit **300** erhalten wurden, und (b) Kontrollprogramme zum Kontrollieren der Funktionen jedes Teils der Vorrichtung. Der Controller **146** kontrolliert die Steuerungsschaltung **137** auf Basis des Kontrollprogramms. Die Steuerungsschaltung **137** steuert den Verteiler **205**, der in **Fig. 2** gezeigt wird, die Spritzenpumpe **133**, die in **Fig. 3** gezeigt wird, die Ventile **101**, **102**, **105**, die Pumpe für positiven Druck **147**, die Pumpe für negativen Druck **148**, und die Laserlichtquelle **117** auf Basis der Kontrolle des Controllers **146**.

Allgemeine Kontrollen

[0050] **Fig. 5** ist ein Flussdiagramm der allgemeinen Kontrolle der automatisierten Bakterienmessvorrichtung **1**, welche durch das Kontrollprogramm bewerkstelligt wird. Nachdem das Behältnis **201a**, welches eine Probe beherbergt, in die Probenhalteinheit **201** gesetzt wird, wird das Behältnis **202a**, welches eine Verdünnungsflüssigkeit beherbergt und das Behältnis **202b**, welches eine Färbeflüssigkeit beherbergt, in die Reagenshalteinheit **202** gesetzt. Das Behältnis **204a** zum Reagieren der Probe und des Reagens (welches zu diesem Zeitpunkt leer ist) wird in den Inkubator **204** der Probenvorbereitungseinheit **200** platziert (**Fig. 2**). Wenn der Startknopf **14** gedrückt wird, startet das Kontrollprogramm und Schritt A (Probenvorbereitungseinheitskontrolle), Schritt B (Detektionseinheitskontrolle) und Schritt C (Analyserkontrolle) werden sequenziell ausgeführt. In dieser Weise werden die Probenvorbereitungseinheit **200**, die Detektionseinheit **300** und der Analyser **141** kontrolliert und die Serie von Arbeitsgängen der automatisierten Bakterienmessvorrichtung **1** werden automatisch durchgeführt. Details des Funktionierens jedes Teils der Vorrichtung in Schritten A, B und C werden nachstehend beschrieben.

Schritt A (Kontrolle der Probenvorbereitungseinheit)

[0051] Das Betreiben der Probenvorbereitungseinheit **200** durch die Probenvorbereitungseinheitskontrolle wird nachstehend in Bezug auf **Fig. 2** beschrieben. Zunächst misst der Verteiler **205** eine festgesetzte Menge der Bakterien enthaltenden Probe aus dem Behältnis **201a** der Probenhalteinheit **201**, und stößt 50 µl in das Behältnis **204a** des Inkubators **204** aus. Als Nächstes misst der Verteiler **205** eine festgesetzte Menge von Verdünnungslösung aus dem Behältnis **202a** der Reagenshalteinheit **202**, und stößt 340 µl in das die Probe enthaltende Behältnis **204a** aus. Der Inkubator **204** mischt die Probe und Untersuchungsprobe und die Verdünnungsflüssigkeit für 10 Sekunden während die Temperatur auf 42°C gehalten wird. Dann misst der Verteiler **205** eine festgesetzte Menge von Färbeflüssigkeit aus dem Behältnis **202b** der Reagenshalteinheit **202** und stößt 10 µl in das Behältnis **204a** aus. Der Inkubator **204** schüttelt und mischt die Flüssigkeiten, um die Reaktion der Färbeflüssigkeit zu induzieren, während das Behältnis **204a** bei 42°C gehalten wird, um eine Probe vorzubereiten. Ungefähr 400 µl der vorbereiteten Probe werden durch den Verteiler **205** aufgenommen und dem Probenbehältnis **102** zugeführt. Die Probe in dem Probenbehältnis **112** fließt zu der Umhüllungsflusszelle **107** der Detektionseinheit **300**, wie nachstehend beschrieben.

Schritt B (Kontrolle der Detektionseinheit)

[0052] Das Betreiben der Detektionseinheit **300** durch die Detektionseinheitskontrolle wird unten beschrieben in Bezug auf **Fig. 3**. Wenn die durch die Probenvorbereitungseinheit **200** vorbereitete Probe in dem Probenbehältnis **112** aufgenommen ist, wird die Pumpe **148**, welche negativen Druck erzeugt, betätigt. Ventile **101** und **102** werden gleichzeitig geöffnet und die Probe füllt den Flussweg **139** zwischen den Ventilen **101** und **102** infolge des negativen Drucks. Danach werden die Ventile **101** und **102** geschlossen.

[0053] Als Nächstes drückt die Spritzenpumpe **133** eine bestimmte Menge der Probe im Flussweg **139** in die Düse **113** und die Probe wird von der Düse **113** ausgestoßen in die Umhüllungsflusszelle **107**. Dann wird durch Öffnen des Ventils **105** gleichzeitig mit dem Ausstoß eine Hüllflüssigkeit aus dem Hüllflüssigkeitsbehälter **109** an die Umhüllungsflusszelle **107** zur Verfügung gestellt.

[0054] In dieser Weise wird die Probe von der Hüllflüssigkeit umgeben, und der Fluss ist beschränkt auf die Öffnung **111**. Durch Beschränken des Flusses der Probe fließen die in der Probe enthaltenen Teilchen in einer linearen Anordnung dahin. Wenn die Probe durch die Öffnung **111** tritt, wird die Hüllflüssigkeit zur Entwässerungsöffnung **114** ausgestoßen.

[0055] Ein von der Laserlichtquelle **117** ausgestrahlter Laserstrahl, welcher durch die Kondensierlinse **118** konstriktiert ist, bestrahlt den Probenfluss **126**, welcher durch die Öffnung **111** fließt.

[0056] Das Laserlicht, welches durch die Umhüllungsflusszelle **107** transmittiert wird ohne die Teilchen in der Probe zu beleuchten, wird durch den Strahlsplitter **119** blockiert. Das vorwärts gestreute Licht und Fluoreszenzlicht, das von den Teilchen, welche mit dem Laserstrahl beleuchtet wurden, ausgestrahlt wird, werden durch die Sammellinse **120** kondensiert und treten durch das Nadelloch **121** der Lichtabschirmung **130** hindurch. Dieses Licht trifft dann auf den dichroiden Spiegel **122**.

[0057] Das Fluoreszenzlicht, welches eine längere Wellenlänge hat als das vorwärts gestreute Licht, wird direkt durch den dichroiden Spiegel **122** transmittiert, durch die Fotoverstärkerröhre **124** detektiert, nachdem das

vorwärts gestreute Licht durch den Filter **123** entfernt worden ist, und ausgegeben als ein Fluoreszenzlichtsignal **127** (ein pulsartiges elektrisches Signal).

[0058] Des Weiteren wird das vorwärts gestreute Licht vom dichroiden Spiegel **122** reflektiert, durch die Fotodiode **125** empfangen und ausgegeben als ein vorwärts gestreutes Lichtsignal **128** (ein pulsartiges elektrisches Signal). Dann wird das Fluoreszenzlichtsignal **127** und das vorwärts gestreute Lichtsignal **128** in einen Informationsprozessor **134**, der in [Fig. 4](#) gezeigt wird, eingegeben.

Schritt C (Kontrolle des Analysers)

[0059] Wenn das Fluoreszenzlichtsignal **127** und das vorwärts gestreute Lichtsignal **128** aus der Detektionseinheit **300** in den Informationsprozessor **134** eingegeben werden, werden die Signale durch den Analyser **141** analysiert. Dies bildet Schritt C (Kontrolle des Analysers) in der allgemeinen Kontrolle der automatisierten Bakterienmessvorrichtung **1**. Das Betreiben des Analysers **141** durch die Analyserkontrolle wird unten beschrieben in Bezug auf das Flussdiagramm der [Fig. 6](#). Obwohl das Programm, welches diese Arbeitsabläufe darstellt, zuvor in dem Speicher **145** gemeinsam mit anderen Programmen gespeichert wird, kann dieses Programm auch von einem externen Speichermedium oder einem Kommunikationsnetzwerk zur Verfügung gestellt werden.

[0060] Zunächst wird das Fluoreszenzlichtsignal **127** und das vorwärts gestreute Lichtsignal **128**, welche durch die Detektionseinheit **300** detektiert wurden, in den Scattergramgenerator **142** des Analysers **141** eingegeben (S1).

[0061] Der Scattergramgenerator **142** berechnet die vorwärts gestreute Lichtintensität Fsc aus dem maximalen Spitzenwert des eingegebenen vorwärts gestreuten Lichtsignals **128** als Teilchengrößeninformation. In ähnlicher Weise wird die Fluoreszenzlichtintensität FL berechnet aus dem Fluoreszenzlichtsignal **127** als Fluoreszenzlichtinformation. Dann wird ein zweidimensionales Scattergram erstellt durch Auftragen der erhaltenen FL auf der X-Achse und von Fsc auf der Y-Achse (S2).

[0062] Die Analyseeinheit **143** unterscheidet die zu Bakterien korrespondierenden Punkte unter den auf dem generierten zweidimensionalen Scattergram erscheinenden Punkten und zählt die Teilchen, die als Bakterien identifiziert wurden (S3). [Fig. 7](#) zeigt ein Beispiel eines zweidimensionalen Scattergrams, das aus einer Bacillus-Bakterien enthaltenden Probe generiert wurde. wie in [Fig. 7](#) gezeigt, wird die Region BCT, in welcher die Bakterien fokussiert sind, zuvor eingestellt durch Unterscheiden der Bakterien von den anderen Teilchen. In dieser Weise werden die Teilchen, welche innerhalb der BCT-Region erscheinen, als Bakterien angesehen, und die Teilchen innerhalb der Region BCT werden als Bakterien gezählt.

[0063] Die Analyseeinheit **143** bestimmt die Varianz der Punkte der Teilchen innerhalb der BCT-Region im X-Y zweidimensionalen Raum, und bestimmt den Richtungsvektor E, in welchem die maximale Varianz durch das Zentrum der Varianz ist. Der bestimmte Richtungsvektor E wird in [Fig. 7](#) gezeigt. Der bestimmte Richtungsvektor E wird dann zu einem Einheitsvektor umgewandelt (ein Vektor mit der Länge von 1), wie in [Fig. 9](#) gezeigt. Der Einheitsvektor wird in eine Komponente in der Richtung der X-Achse und eine Komponente in der Richtung der Y-Achse aufgeteilt, und die Größe der Komponente in der Richtung der Y-Achse wird als P bezeichnet (S4). P ist ein Wert, der den Grad der Steigung des Richtungsvektors in Bezug auf die X-Achse angibt.

[0064] [Fig. 8](#) zeigt ein Beispiel eines zweidimensionalen Scattergrams, das aus einer Coccus-enthaltenden Probe generiert wurde, und gibt den bestimmten Richtungsvektor, ähnlich zu [Fig. 7](#) an. Ein Vergleich von [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) zeigt klar, dass der Steigungsgrad des Richtungsvektors relativ zur X-Achse in der Coccus-enthaltenden Probe ([Fig. 8](#)) größer ist als in der Bacillus-enthaltenden Probe ([Fig. 7](#)). Somit ist auch der Wert P in der Coccus-enthaltenden Probe ([Fig. 8](#)) größer als in der Bacillus-enthaltenden Probe ([Fig. 7](#)). Die Bestimmungseinheit **144** vergleicht den Wert P, der durch die Analyseeinheit **143** berechnet wurde, mit einem vorherbestimmten Wert A (in diesem Fall, $A = 0,68$) (S5). Wenn $P \geq A$, werden die in der Probe enthaltenen Bakterien als Coccus bestimmt (S6 und S7), wohingegen, wenn $P < A$, die Bakterien als Bacillus bestimmt werden (S6 und S8).

[0065] Das Ergebnis der Bestimmung durch die Bestimmungseinheit **144** wird kombiniert mit dem in S2 kreierten Scattergram und mit der in S3 berechneten Bakterienzahl und auf das Flüssigkristall-Touchpanel **11** ausgegeben (S9). Ein Beispiel der Bildschirmausgabe auf dem Flüssigkristall-Touchpanel **11** wird in [Fig. 10](#) gezeigt. Das Scattergram, das Bakterienbestimmungsergebnis und die Bakterienzahl werden dargestellt. An den Stellen, welche das Bestimmungsergebnis für die Bakterienart anzeigen, wird eine Markierung in der [Bacillus]

Kategorie angezeigt unter den [Bacillus] und [Coccus] Kategorien, um anzuzeigen, dass das Bestimmungsergebnis Bacillus ist.

Beispiele von Probenmessergebnissen

[0066] Die Messung einer Probe unter Verwendung der automatisierten Bakterienmessvorrichtung **1**, die oben beschrieben wurde, und die Bestimmungsergebnisse der Bakterienart werden nachstehend beschrieben.

Proben

[0067] Die unten beschriebenen Proben (a) bis (g) wurden verwendet.

- (a) Menschlicher Urin, enthaltend *E. aerogenes* (Bacillus).
- (b) Menschlicher Urin, enthaltend *E. coli* (Bacillus).
- (c) Menschlicher Urin, enthaltend *S. aureus* (Coccus).
- (d) Menschlicher Urin, enthaltend *S. epidermis* (Coccus).
- (e) Herzinfusionslösung, gemischt mit *E. coli* (Bacillus) (Bakterienzahl ungefähr $6 \times 10^5/\text{ml}$).
- (f) Herzinfusionslösung, gemischt mit *P. aeruginosa* (kleine Bacillus-Art) (Bakterienzahl ungefähr $6 \times 10^5/\text{ml}$).
- (g) Herzinfusionslösung, gemischt mit *S. aureus* (Coccus) (Bakterienzahl ungefähr $6 \times 10^5/\text{ml}$).

Bestimmungsreagenzien

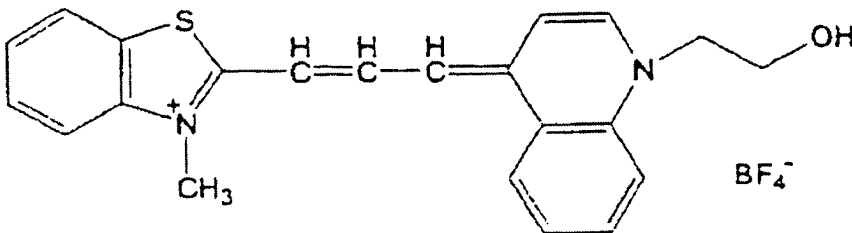
[0068] Die Proben wurden prozessiert unter Verwendung der Verdünnungsflüssigkeiten und Färbeflüssigkeiten, die unten aufgezählt sind, als Reagenzien beim Vorbereiten der Bestimmungsproben.

Bestimmungsflüssigkeiten

Zitronensäure	100 mM
Natriumsulfat	90 mM
Amidoschwefelsäure	100 mM
NaOH	genug, um pH 2,5 zu erreichen
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	1 g
gereinigtes Wasser	1 Liter

Färbungsflüssigkeiten

Der Farbstoff mit der unten angegebenen Strukturformel 40 mg



Ethylenglykol

1 Liter

[0069] Die zweidimensionalen Scattergramme, die aus den Messergebnissen der Proben (a), (b), (c) und (d) erhalten wurden, werden in [Fig. 11](#), [Fig. 12](#), [Fig. 13](#) bzw. [Fig. 14](#) gezeigt. In allen Fällen ist FL auf der X-Achse aufgetragen (horizontale Achse), und Fsc ist aufgetragen auf der Y-Achse (vertikale Achse). Die Werte für P, die aus den zweidimensionalen Scattergrammen in [Fig. 11](#) bis [Fig. 14](#) berechnet wurden, und die Bestimmungsergebnisse für die Bakterienart, welche auf den Flussdiagrammen basieren, werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Probe	Bakterientyp	P-Wert	Bestimmungs- ergebnis
(a)	<i>E. aerogenes</i> (Bacillus)	0,27	Bacillus
(b)	<i>E. coli</i> (Bacillus)	0,23	Bacillus
(c)	<i>S. aureus</i> (Coccus)	0,83	Coccus
(d)	<i>S. epidermidis</i> (Coccus)	0,77	Coccus

[0070] Wie in Tabelle 1 gezeigt, sind die P-Werte, welche für Bacillus-enhaltende Proben berechnet werden, kleiner als die P-Werte, die aus Coccus-enhaltenden Proben berechnet werden. Des weiteren stimmen die Bakterientyp-Bestimmungsergebnisse auf Basis des Ergebnisses des Vergleichs des P-Werts, erhalten von jeder Probe, und dem vorherbestimmten Wert A (in diesem Fall $A = 0,68$) mit den tatsächlichen Bakterientypen überein.

[0071] Die von den Messergebnissen der Proben (e), (f) und (g) erhaltenen zweidimensionalen Scattergramme werden in [Abb. 15](#), [Abb. 16](#) bzw. [Fig. 17](#) gezeigt. In allen Fällen wird FL auf der X-Achse aufgetragen (horizontale Achse), und Fsc wird auf der Y-Achse aufgetragen (vertikale Achse). Die Werte von P, die aus den zweidimensionalen Scattergrammen in [Fig. 15](#) bis [Fig. 17](#) berechnet wurden und die Bakterienart-Bestimmungsergebnisse auf Basis der Flussdiagramme werden in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Probe	Bakterientyp	P-Wert	Bestimmungs- ergebnis
(e)	<i>E. coli</i> (Bacillus)	0,35	Bacillus
(f)	<i>E. aeruginosa</i> (Bacillus)	0,21	Bacillus
(g)	<i>S. aureus</i> (Coccus)	0,74	Coccus

[0072] Wie in Tabelle 2 gezeigt, sind die P-Werte, die aus Bacillus-enhaltenden Proben berechnet wurden, kleiner als die P-Werte, die aus Coccus-enhaltenden Proben berechnet wurden.

[0073] Des weiteren stimmen die Bakterienart-Bestimmungsergebnisse auf Basis des Ergebnisses des Vergleichs des P-Werts, erhalten von jeder Probe, und dem vorher bestimmten Wert A (in diesem Fall $A = 0,68$) mit den tatsächlichen Bakterienarten überein. Wenn der große Bacillus *E. coli* und der kleine Bacillus *P. aeruginosa* verglichen werden, erscheint *P. aeruginosa* oft in einer Position eines geringeren Werts für Fsc in dem zweidimensionalen Scattergram, so dass ein Unterschied in dem Zustand der Verteilung auftritt. Jedoch können sowohl *E. coli* als auch *P. aeruginosa* genau bestimmt werden durch die Bakterientyp-Bestimmung auf Basis des P-Werts.

Bestimmungsgenauigkeit

[0074] Menschliche Urinproben, deren Bakterien durch die Agarplatten-Kulturmethode typisiert worden waren, wurden unter Verwendung der automatisierten Bakterienmessvorrichtung 1 gemessen, und die Bakterien-Typisierungsbestimmungsgenauigkeit wird in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

	Bacillus- enthaltende Proben	Coccus- enthaltende Proben	insgesamt
Anzahl der Proben	53	26	79
Anzahl von Übereinstimmungen	47	21	68
Genauigkeit (%)	88,7	80,1	86,1

[0075] Wie in Tabelle 3 gezeigt, wurden 47 Übereinstimmungen (Genauigkeit 88,7 %) erhalten unter den Bacillus-enthaltenden Proben, und 21 Übereinstimmungen (Genauigkeit 80,1 %) wurden erhalten unter den Coccus-enthaltenden Proben. Des weiteren gab es 68 Übereinstimmungen (Genauigkeit 86,1 %) unter den gesamten 79 Bacillus-enthaltenden Proben und Coccus-enthaltenden Proben. Demgemäß hat die Bakterienmessvorrichtung der vorliegenden Ausführungsform eine hohe Bestimmungsgenauigkeit von größer als 80 %.

[0076] [Fig. 18](#) zeigt eine Modifikation der Sequenz des in [Fig. 6](#) gezeigten Flussdiagramms. Dieses Beispiel modifiziert nur die Sequenz, wenn $P < A$ in S6, und stimmt im übrigen mit [Fig. 6](#) überein.

[0077] In dem Flussdiagramm von [Fig. 18](#) vergleicht die Bestimmungseinheit 144 den Parameter P und einen vorher bestimmten Wert B, welcher kleiner ist als A (z.B. $B = 0,60$), wenn $P < A$ (S6a). Wenn $P < B$ (S6b), werden die in den Proben enthaltenen Teilchen als Bacillus bestimmt (S8) und wenn $A > P \geq B$, wird die Bestimmung als schwierig angesehen (S6b und S6c).

[0078] Bildschirmausgaben, die zu diesen Bestimmungsergebnissen korrespondieren, werden ausgegeben an das Flüssigkristall-Touchpanel 11 (S9). Des weiteren wird das in S2 erstellte Scattergram, und die Bakterienzahl, die in S3 berechnet wurde, kombiniert und an das Flüssigkristall-Touchpanel 11 ausgegeben. Ein Beispiel der Bildschirmausgabe auf dem Flüssigkristall-Touchpanel 11 wird in [Fig. 19](#) gezeigt. Das zweidimensionale Scattergram, Bakterientypisierungsbestimmungsergebnis und die Bakterienzahl werden dargestellt. An den Stellen, die die Bestimmungsergebnisse für die Art der Bakterien anzeigen, wird eine Markierung angezeigt, in der [Bestimmung schwierig] Kategorie unter den [Bacillus], [Coccus] und [Bestimmung schwierig] Kategorien, um anzuzeigen, dass das Bakterientypisierungsbestimmungsergebnis für diese Probe schwierig ist.

[0079] Wenn $A > P \geq B$ in S6b des Flussdiagramms von [Fig. 18](#) und die Bestimmung schwierig ist, wird eine Ausgabe, dass die Bestimmung schwierig ist, ausgegeben, wie in [Fig. 19](#) gezeigt, ohne zu bestimmen, ob die Bakterienart Bacillus oder Coccus ist. Das Vorhandensein von Bakterien, ob Bacillus oder Coccus, kann jedoch nahegelegt werden, oder die Möglichkeit des Vorhandenseins von Bakterien kann angezeigt werden, ohne die Art anzugeben.

[0080] Des weiteren kann beim Ausgeben des Bakterientypisierungsbestimmungsergebnisses der Grad der Verlässlichkeit des Bestimmungsergebnisses auch ausgegeben werden. Wenn z.B. die Bakterien in einer Probe bestimmt werden als entweder Bacillus oder Coccus, kann der Unterschiedlichkeitsgrad des berechneten Werts P und des vorher bestimmten Werts A berechnet werden und ausgegeben werden, wie in dem Flussdiagramm in [Fig. 6](#). Je größer der Unterschiedlichkeitsgrad, desto größer die Verlässlichkeit des Bestimmungsergebnisses. Wenn entweder [Bacillus], [Coccus] oder [Bestimmung schwierig] bestimmt wird wie in dem Flussdiagramm von [Fig. 18](#), wenn Coccus bestimmt wird ($P > A$), wird der Unterschiedlichkeitsgrad zwischen dem P-Wert und dem vorher bestimmten Wert A berechnet. Je größer der Unterschiedlichkeitsgrad, desto höher die Verlässlichkeit des Ergebnisses der Bestimmung, dass die Bakterien Coccus sind. Wenn Bacillus bestimmt wird ($P < B$), wird der Unterschiedlichkeitsgrad zwischen dem P-Wert und dem vorher bestimmten Wert B berechnet. Je größer der Unterschiedlichkeitsgrad, desto größer die Verlässlichkeit des Bestimmungsergebnisses, dass die Bakterien Bacillus sind.

[0081] Obwohl die vorliegende Erfindung oben in Bezug auf Beispiele von derzeit bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, ist die vorliegende Erfindung nicht auf diese Beispiele limitiert. Die vorliegende Erfindung bestimmt einfach, ob Bakterien in einer Probe Bacillus oder Coccus sind anhand der Verteilung des Scattergrams, das anhand der Bakteriengrößeninformation und der Fluoreszenzlichtinformation erstellt wird.

Da Bakterienkulturen in der vorliegenden Erfindung nicht nötig sind, ist es möglich, die Bakterienart sehr schnell und effizient zu bestimmen.

[0082] Die voran stehende detaillierte Beschreibung ist zur Verfügung gestellt worden als Erklärung und Illustration und dient nicht dazu, den Umfang der beigefügten Ansprüche zu limitieren. Viele Variationen der vorliegenden bevorzugten Ausführungsformen, die hierin illustriert werden, sind für den Fachmann naheliegend und verbleiben innerhalb des Bereichs der angefügten Ansprüche und ihrer Äquivalente.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen von Bakterien umfassend:
Fluoreszenzfärben von Bakterien in einer Probe,
Detektieren von Größeninformation der Bakterien in der Probe und von Fluoreszenzinformation, die die Intensität des von den Bakterien ausgestrahlten Fluoreszenzlichts darstellt,
Analysieren der detektierten Größeninformation und Fluoreszenzinformation und
basierend auf dem Ergebnis des Analysierens, Bestimmen, ob die Bakterien in der Probe Bazillus oder Coccus sind.
2. Das Verfahren zur Messung von Bakterien gemäß Anspruch 1, worin besagtes Analysieren umfasst:
Herstellen eines Scattergrams, welches die Verteilung der Bakterien basierend auf der detektierten Größeninformation und Fluoreszenzinformation darstellt, und
Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram.
3. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, worin bei der Analyse ein Wert bestimmt wird, der den Zustand der Verteilung darstellt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, worin beim Analysieren die Richtung der maximalen Varianz der Verteilung bestimmt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, worin beim Analysieren der Anstieg der Richtung der maximalen Varianz bestimmt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin ein Fluoreszenzfarbstoff, geeignet zum Färben von intrazellulärem Material der Bakterien, verwendet wird, um die Bakterien zu färben.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin ein Fluoreszenzfarbstoff, geeignet zum Färben von Nukleinsäure in den Bakterienzellen, verwendet wird, um die Bakterien zu färben.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin ein Polymethinfluoreszenzfarbstoff verwendet wird, um die Bakterien zu färben.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die Größeninformation der Bakterien die Intensität des gestreuten Lichts, erhalten von den Bakterien, umfasst.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die Größeninformation der Bakterien auf der Basis einer Veränderung im elektrischen Widerstand, welcher verursacht wird, wenn die Bakterien durch eine Pore, an die eine Spannung angelegt wurde, hindurchtreten, detektiert wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die Fluoreszenzinformation und die Größeninformation der Bakterien durch Durchflusszytometry bestimmt werden.
12. Eine Bakterienmessvorrichtung umfassend:
eine Probenentnahmevorrichtung zum Entnehmen einer Probe, umfassend fluoreszenzgefärbte Bakterien,
einen ersten Detektor zum Detektieren der Größeninformation von jedem Bakterium in der Probe,
einen zweiten Detektor zum Detektieren von Fluoreszenzinformation, welche die Intensität des Fluoreszenzlichts, ausgestrahlt von jedem Bakterium in der Probe, darstellt, und
eine Kontrolleinheit, die konfiguriert ist zur Analyse der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation und zur Bestimmung auf Basis des Analyseergebnisses, ob die Bakterien in der Probe Bazillus oder Coccus sind.
13. Die Bakterienmessvorrichtung gemäß Anspruch 12, worin besagte Kontrolleinheit eine Kontrolleinheit

ist, die zur Herstellung eines Scattergrams der Bakterien unter Verwendung der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation als Parameter konfiguriert ist, zum Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 12 oder 13, des weiteren umfassend einen Ausgabeteil, worin die Kontrolleinheit auf Basis der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation ein Scattergram herstellt, und die Ausgabeeinheit das hergestellte Scattergram ausgibt.

15. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, worin die Kontrolleinheit einen Wert bestimmt, der den Zustand der Verteilung darstellt.

16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, worin die Kontrolleinheit eine Richtung der maximalen Varianz der Verteilung bestimmt.

17. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, worin die Kontrolleinheit eine Steigung der Richtung der maximalen Varianz bestimmt.

18. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, worin der erste Detektor gestreutes Licht, erhalten von den Bakterien, detektiert.

19. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, worin der erste Detektor umfasst:
ein Element mit einer Pore zum Hindurchtreten der Bakterien und
erste und zweite Elektroden,
worin der erste Detektor den elektrischen Widerstand zwischen der ersten und der zweiten Elektrode misst, welcher durch das Hindurchtreten der Bakterien durch die Pore generiert wird.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, desweiteren umfassend:
eine Flusszelle zum Fließen der Probe enthaltend die Bakterien und
eine Laserlichtquelle zum Bestrahlen der Probe innerhalb der Flusszelle,
worin der erste Detektor gestreutes Licht, ausgestrahlt von den Bakterien in der Probe, welche durch die Laserlichtquelle bestrahlt wurden, detektiert, und worin der zweite Detektor das von den Bakterien in der Probe, bestrahlt mit der Laserlichtquelle, ausgestrahlte Fluoreszenzlicht detektiert.

21. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, desweiteren umfassend:
einen Probenhalteteil zum Einbringen einer Probe,
einen Reagenzhalteteil zum Einbringen eines Fluoreszenzfarbstoffreagenz und
einen Mischteil zum Herstellen einer Probe durch Mischen der Probe und des Fluoreszenzfarbstoffreagenz.

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12–14, desweiteren umfassend einen Ausgabeteil zum Ausgeben eines durch die Kontrolleinheit bestimmten Resultats.

23. Vorrichtung gemäß Anspruch 22, worin der Ausgabeteil eine Warnung ausgibt, wenn die Kontrolleinheit bestimmt hat, dass die Bestimmung des Bakterientyps schwierig ist.

24. Vorrichtung gemäß Anspruch 22, worin der Ausgabeteil einen Grad an Verlässlichkeit für die bestimmte Art der Bakterien ausgibt.

25. Speichermedium, das ein computerausführbares Programm zum Analysieren von Bakterien speichert, das Programm umfassend:
Erhalten von Größeninformationen der Bakterien und Fluoreszenzinformation, die die Intensität des von den Bakterien ausgestrahlten Fluoreszenzlichts darstellt,
Generieren eines Scattergrams, das die Verteilung der Bakterien basierend auf der Größeninformation und der Fluoreszenzinformation darstellt,
Analysieren der Verteilung der Bakterien in dem Scattergram und
Bestimmen, ob die Bakterien Bazillus oder Coccus sind, basierend auf einem Ergebnis des Analysierens.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

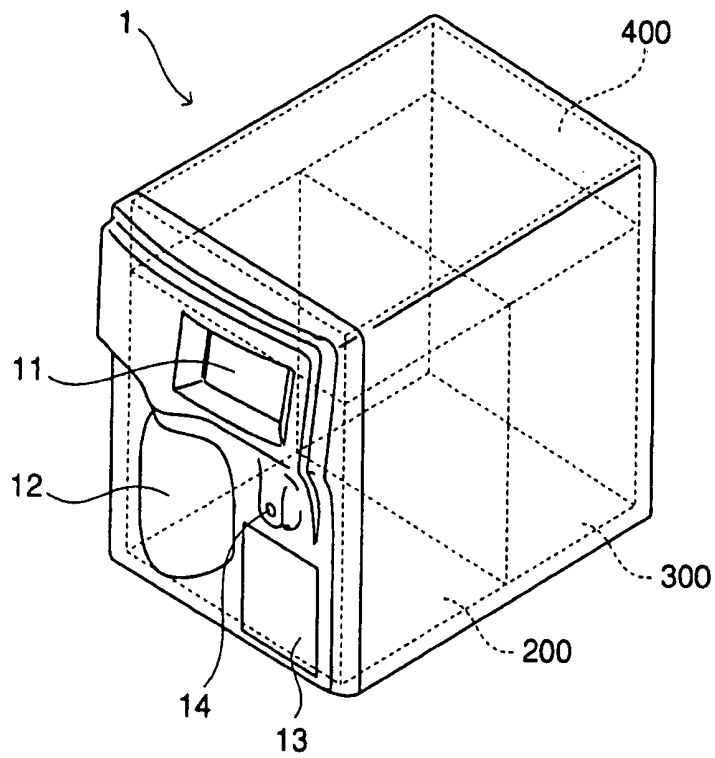


Fig. 1

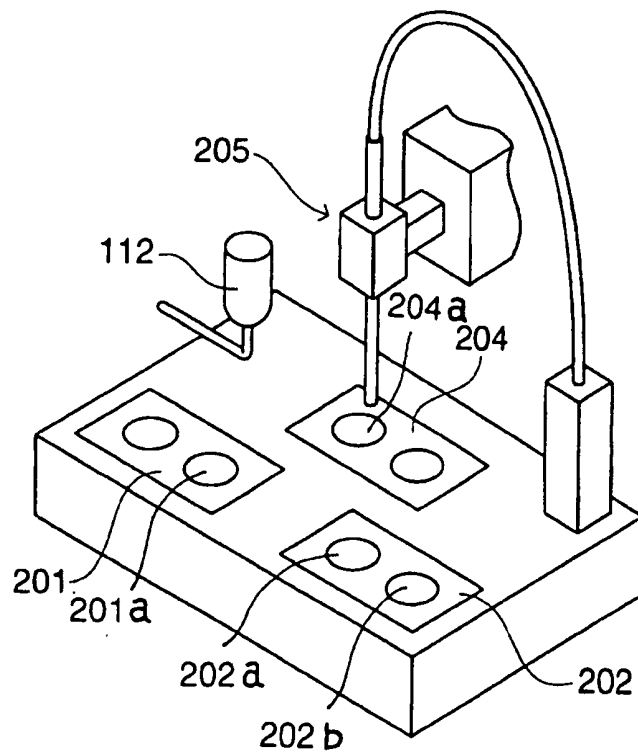


Fig. 2

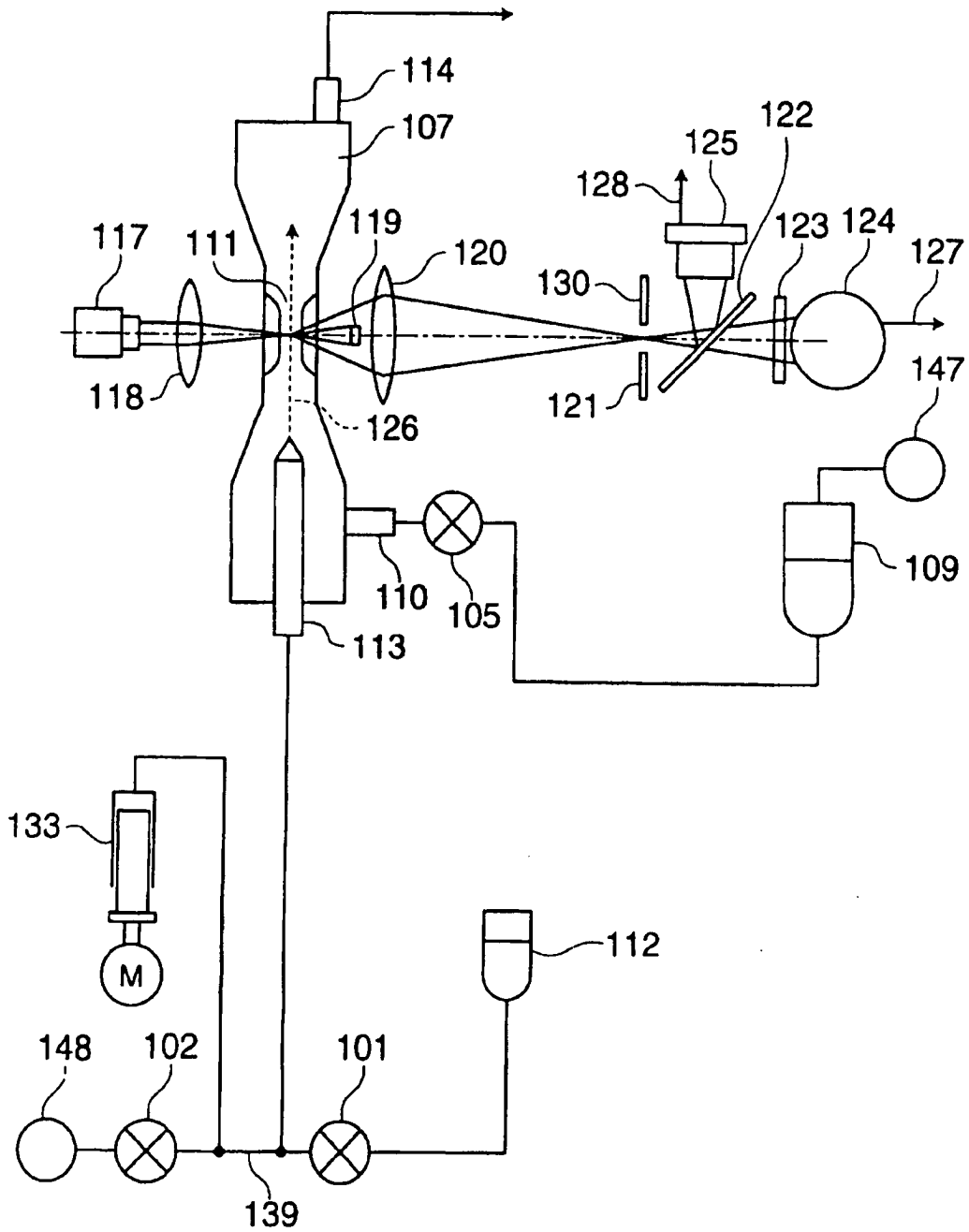


Fig. 3

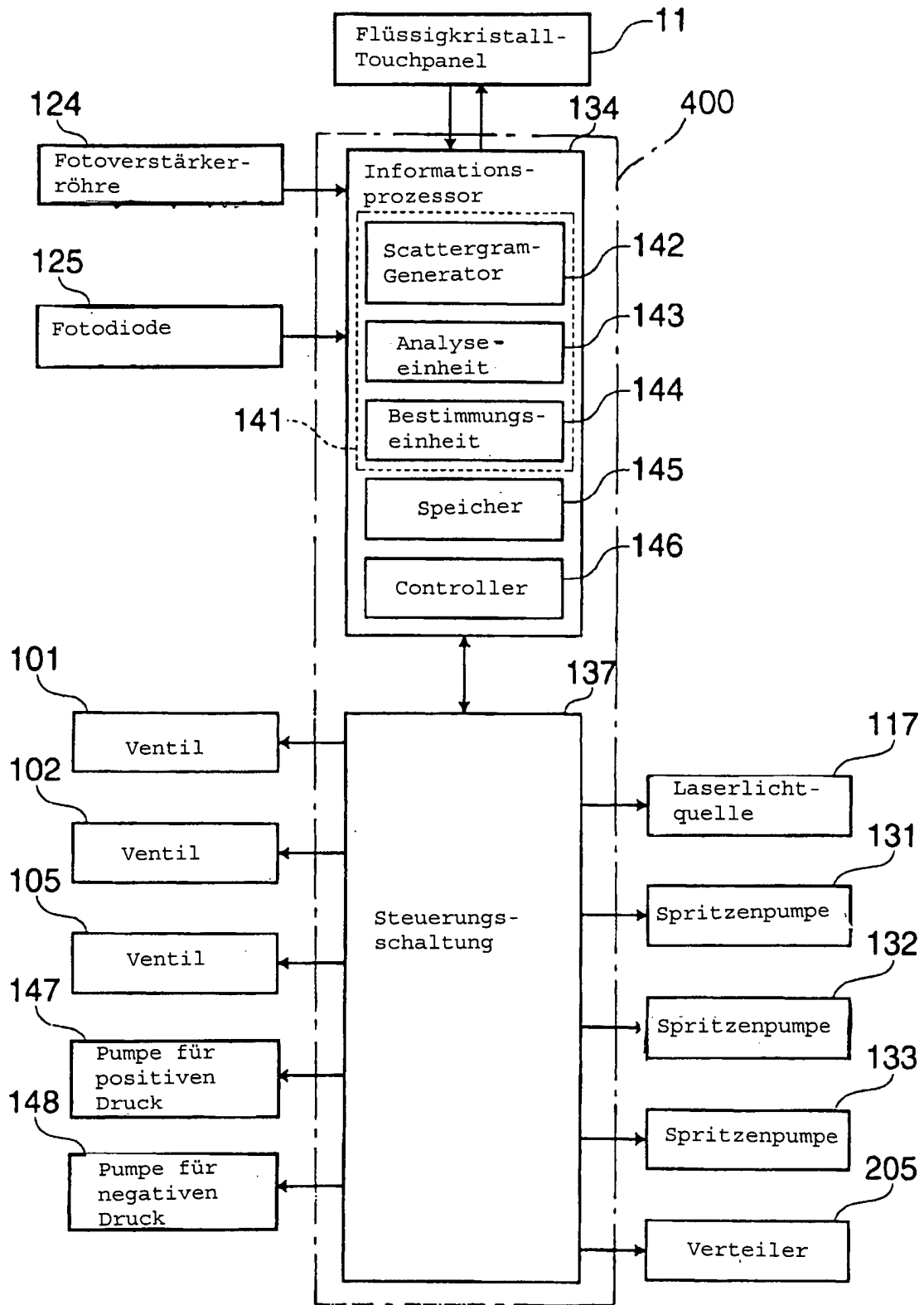


Fig. 4

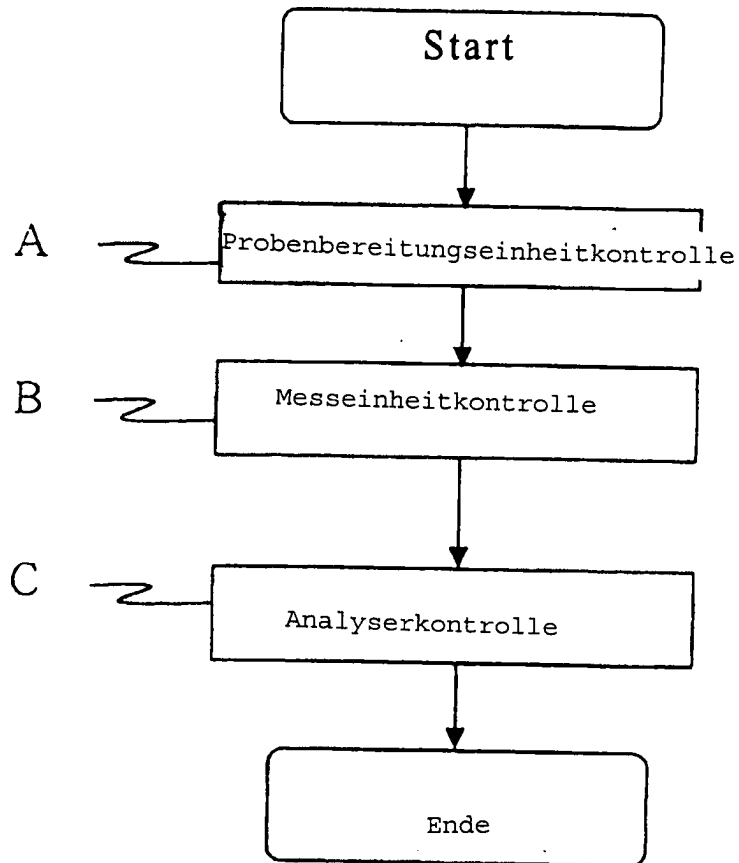


Fig. 5

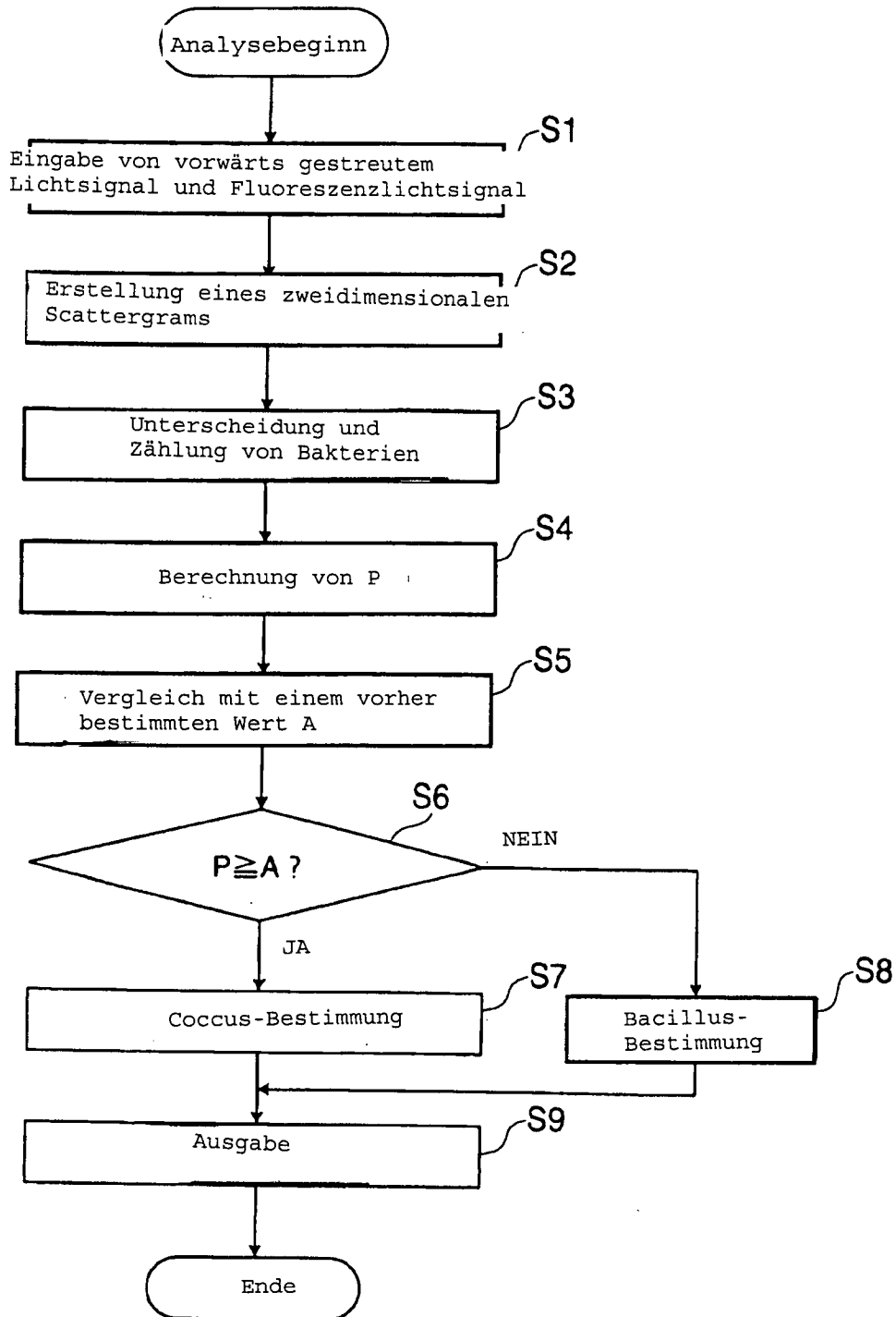


Fig. 6

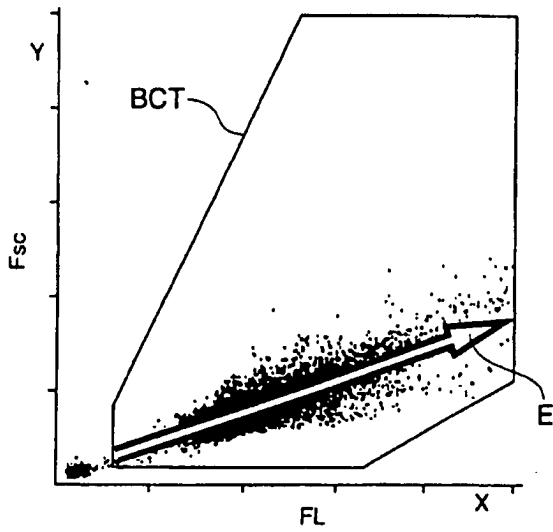


Fig. 7

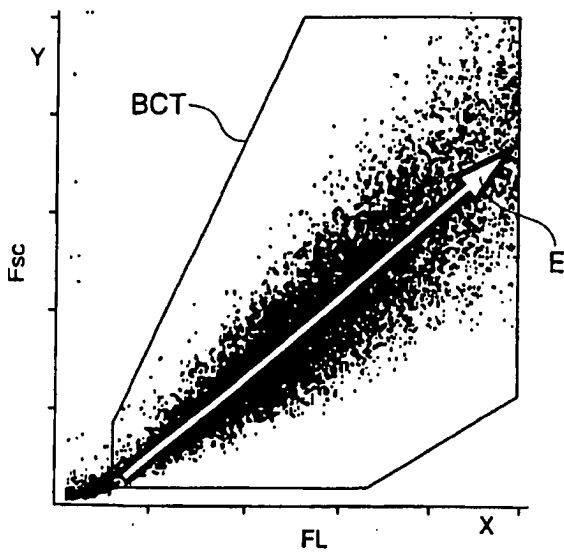


Fig. 8

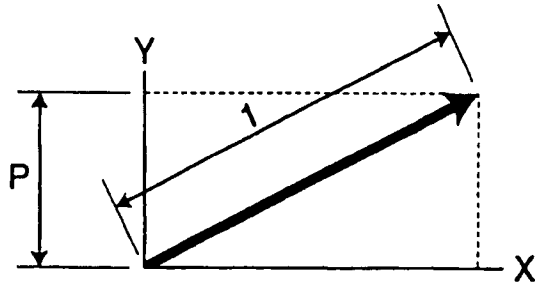


Fig. 9

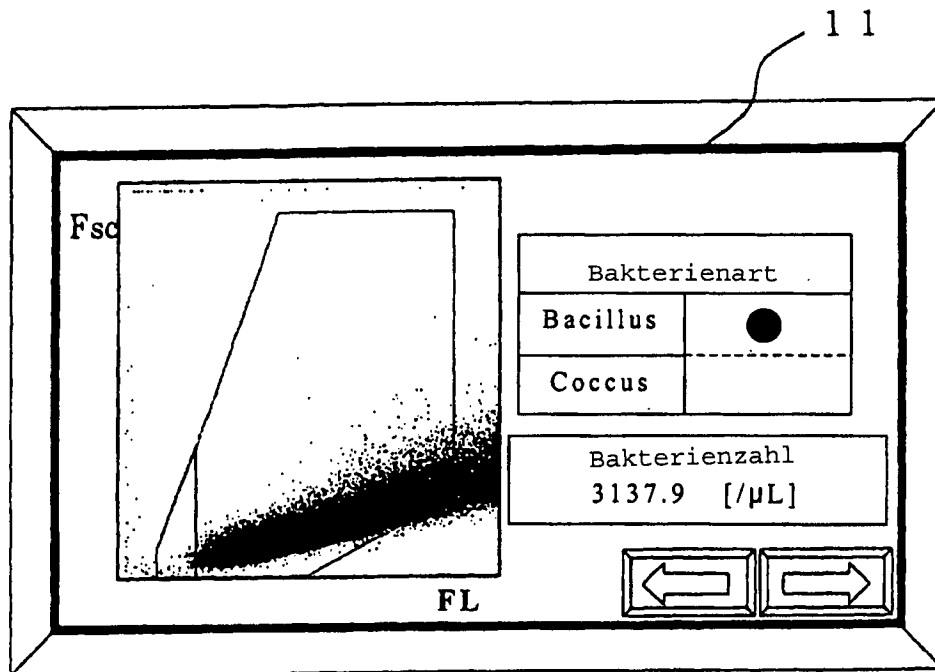


Fig. 10

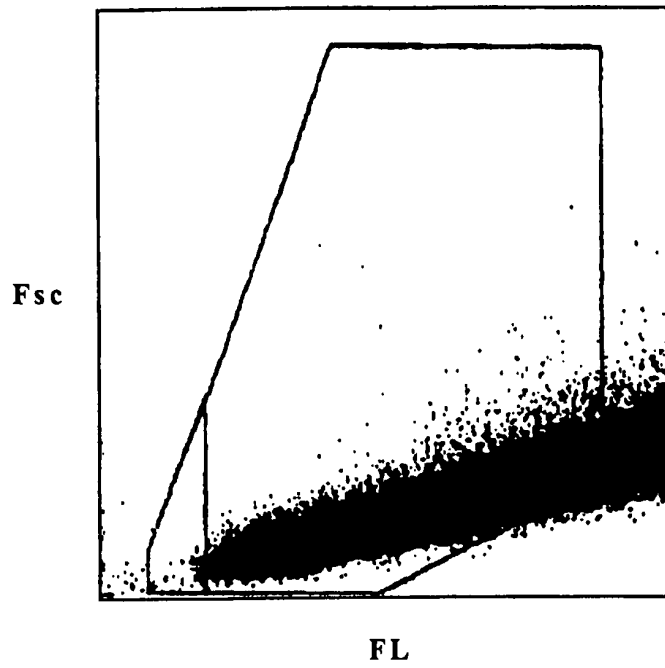


Fig. 11

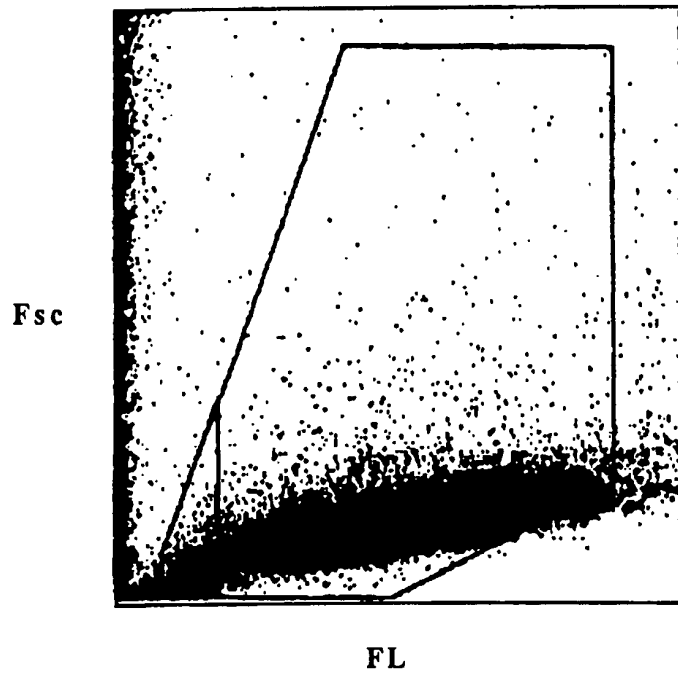


Fig. 12

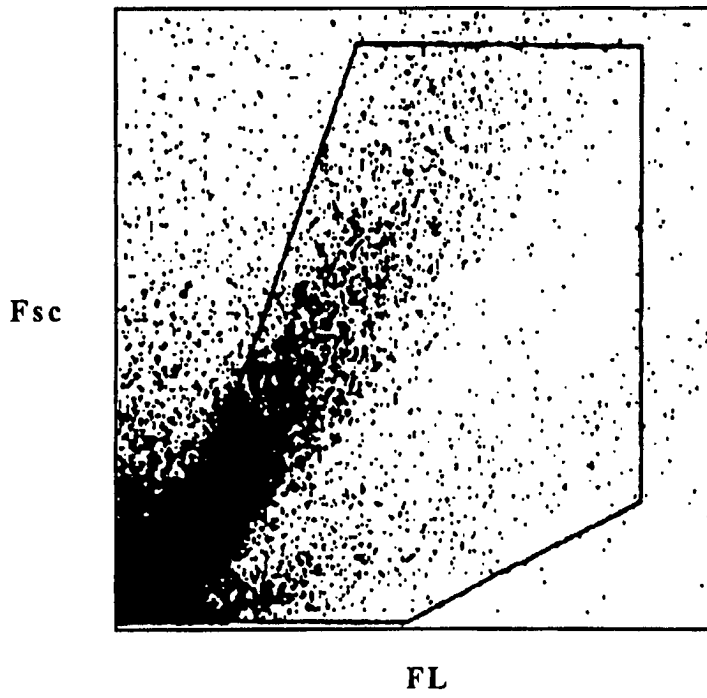


Fig. 13

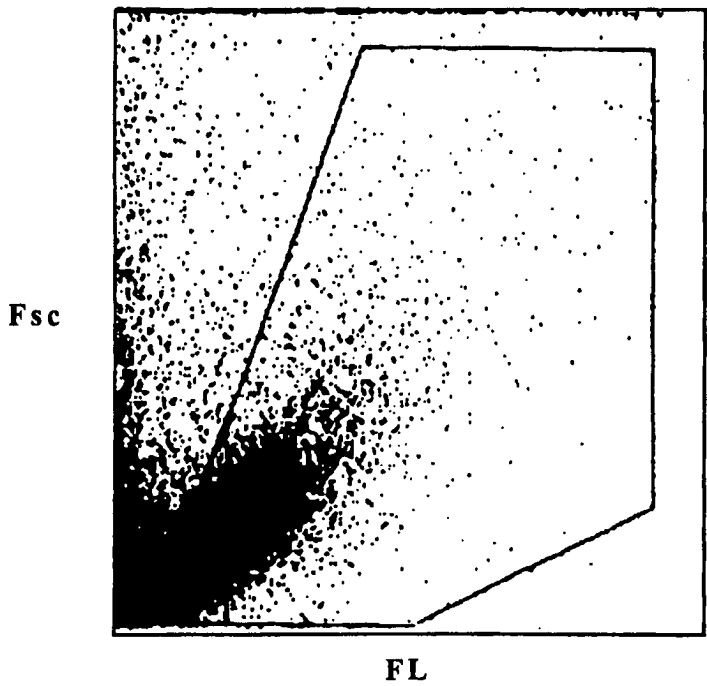


Fig. 14

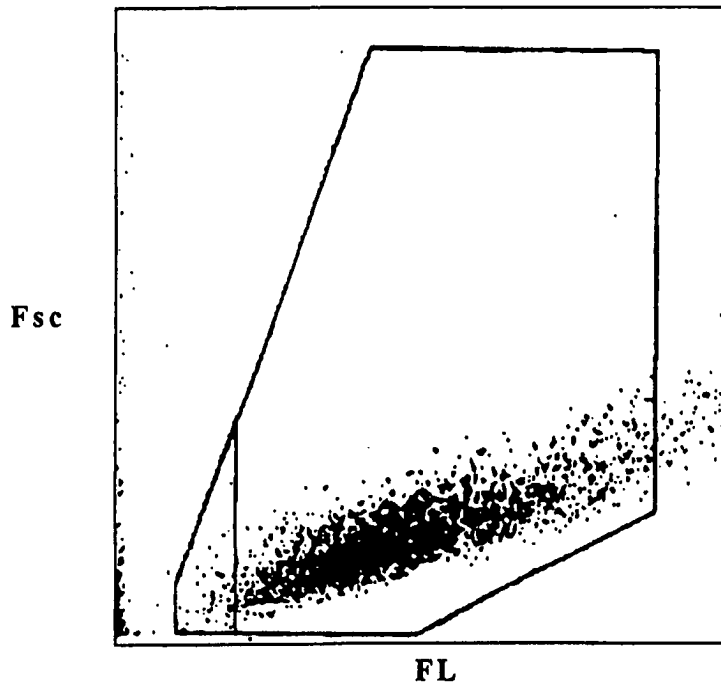


Fig. 15

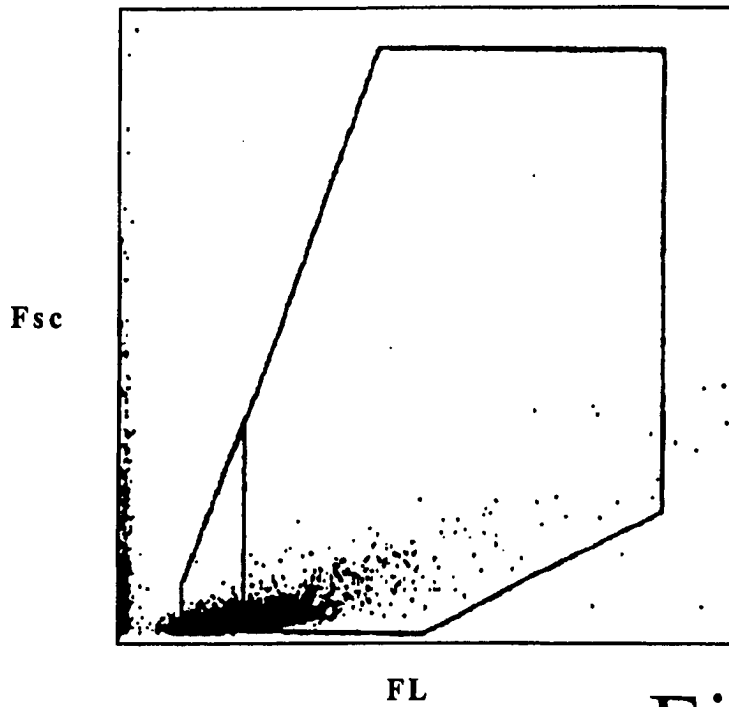


Fig. 16

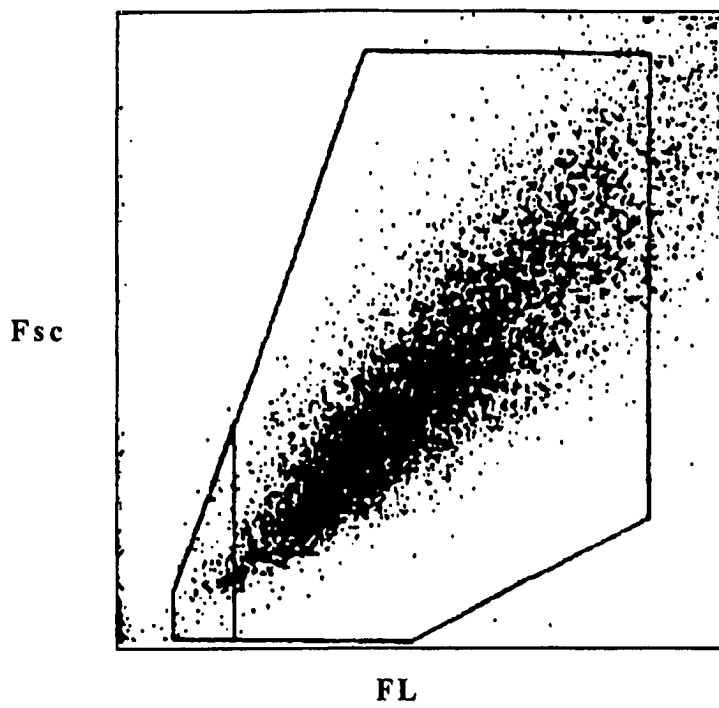


Fig. 17

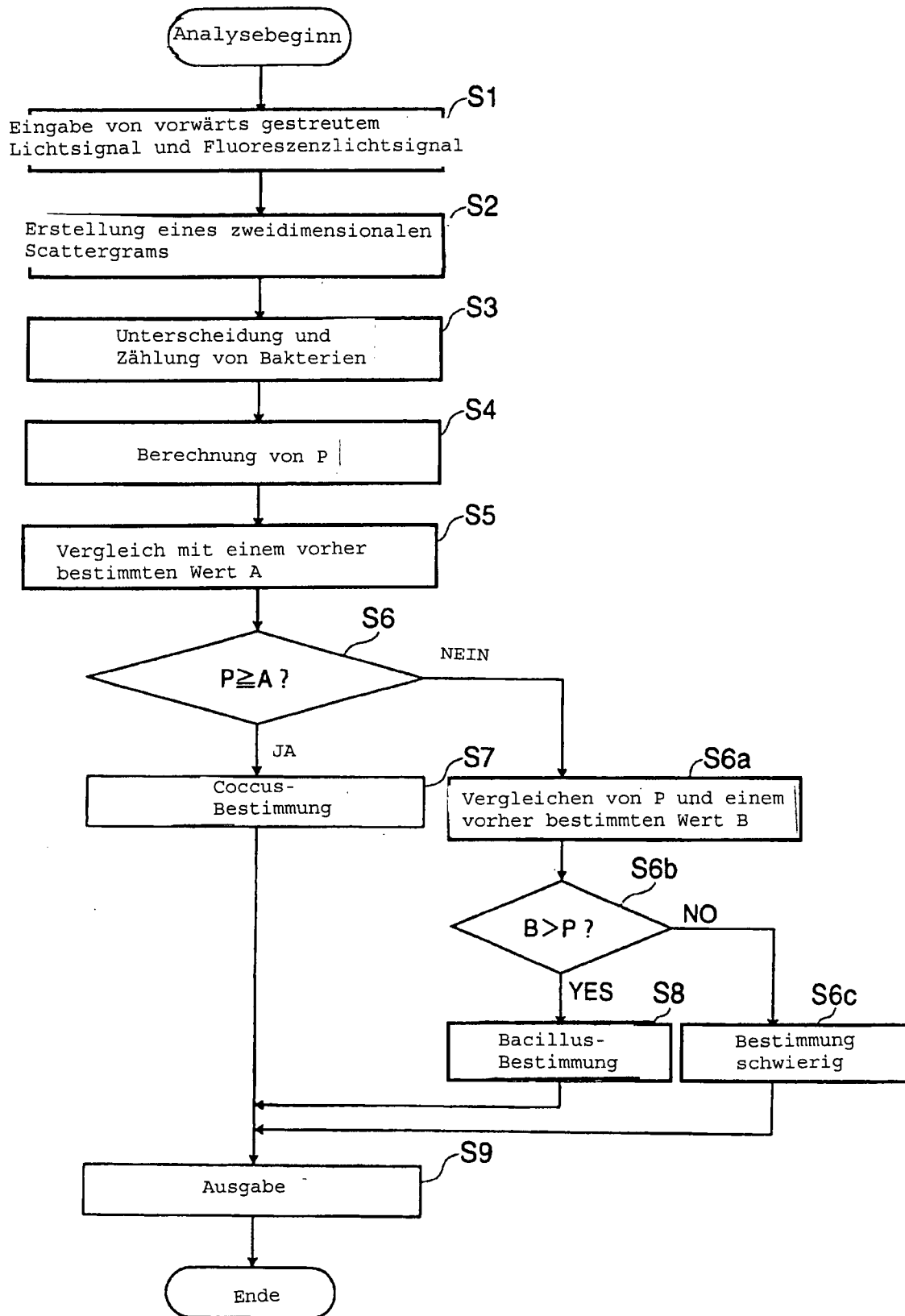


Fig. 18

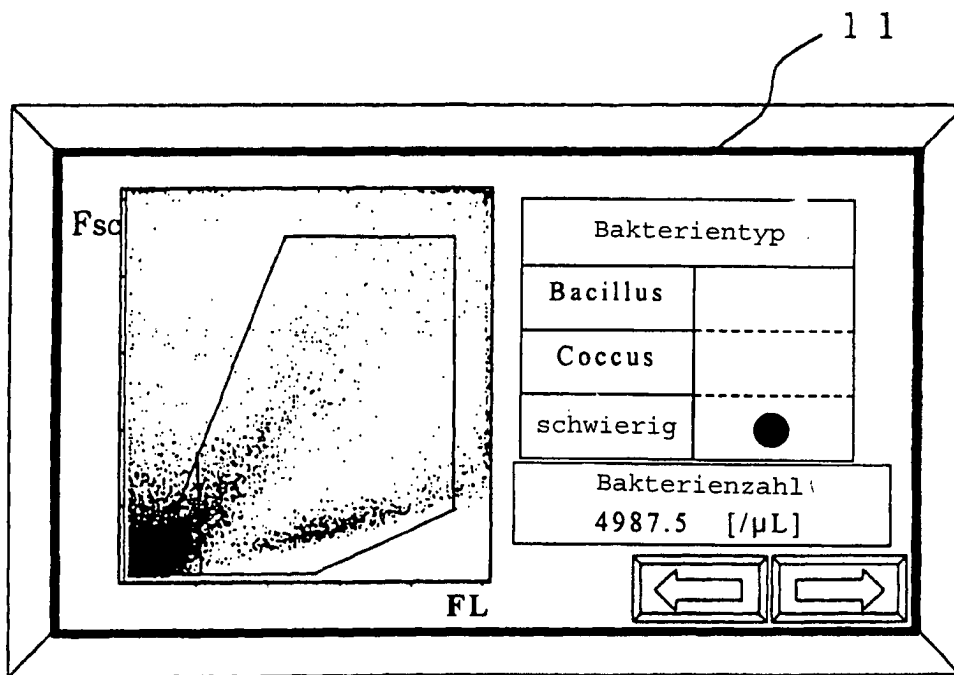


Fig. 19