



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113667584 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 31

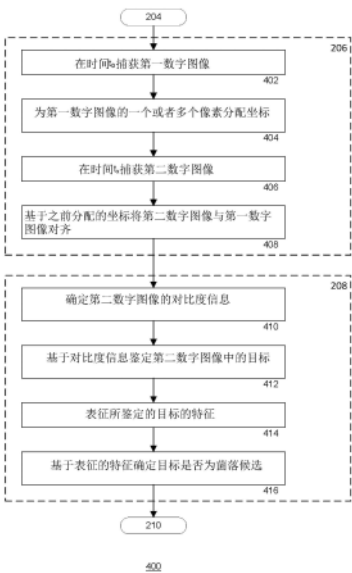
(21) 申请号 202110959362.3
(22) 申请日 2016.04.22
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113667584 A
(43) 申请公布日 2021.11.19
(30) 优先权数据
62/151,681 2015.04.23 US
62/318,483 2016.04.05 US
(62) 分案原申请数据
201680022999.7 2016.04.22
(73) 专利权人 BD科斯特公司
地址 荷兰,德拉赫滕
(72) 发明人 T·M·威尔斯 R·R·玛赛珀利
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 1/22 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)
G06V 20/69 (2022.01)
G06V 10/40 (2022.01)
G06T 7/00 (2017.01)
(56) 对比文件
CN 103518224 A,2014.01.15
CN 107771212 A,2018.03.06
CN 1582327 A,2005.02.16
WO 9618720 A1,1996.06.20
审查员 任爱琳

权利要求书3页 说明书31页 附图23页

(54) 发明名称
菌落对比度收集

(57) 摘要
本发明的名称是菌落对比度收集。用于微生物生长检测的成像系统和方法,其使用随着时间显现的差异评估对于给定的样品是否发生微生物生长。



1. 一种系统,其用于鉴定用生物样品接种并且布置在光学透明的容器内的培养基中的生长,所述系统包括:

用于捕获所述培养基的数字图像的图像获取装置;

储存关于捕获的数字图像的信息的存储器;以及

可操作地执行指令以实施以下指令的一个或者多个处理器:

当从培育箱接收的接种培养基被接收到图像获取装置中时,在第一时间(t_0)获得所述接种的培养基的第一数字图像,所述第一数字图像具有多个像素;

确定所述第一数字图像中的像素相对于携带所述接种的培养基的光学透明容器的坐标;

在进一步孵育所述接种的培养基之后,再次将所述接种的培养基接收到所述图像获取装置中,并且所述一个或者多个处理器执行以下步骤:

在第二时间(t_x)获得所述接种的培养基的第二数字图像,所述第二数字图像具有多个像素;

将所述第一数字图像与所述第二数字图像对齐,从而所述第二数字图像中的像素的坐标对应于所述第一数字图像中相应像素的坐标;

比较所述第二数字图像的像素与所述第一数字图像的相应像素;

鉴定在所述第一数字图像和所述第二数字图像之间变化的像素,其中在所述第一数字图像和所述第二数字图像之间没有变化的像素指示背景;

确定所述第二数字图像中哪些鉴定的像素与指示背景的像素具有预定水平的阈值对比度;

鉴定所述第二数字图像中的一个或者多个目标,每个目标由满足预定水平的阈值对比度的像素组成,并且其彼此不被背景像素隔开;

对于所述鉴定的目标的至少一个,从所述目标的像素确定所述目标的形态;并且

从所述目标的形态,确定所述目标是否为菌落候选;并且

提供与所述目标相关联的所述像素的坐标至存储器。

2. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

从与鉴定的目标相关联的关于像素的信息中获得目标特征,其中所述目标特征包括目标形状、目标大小、目标边缘和目标颜色中的至少一种,其中所述鉴定的目标的形态基于所述目标特征确定。

3. 根据权利要求2所述的系统,其中所述目标颜色由与所述鉴定的目标相关联的像素的光谱特征确定。

4. 根据权利要求3所述的系统,其中所述光谱特征选自像素颜色、色调、照度和色度。

5. 根据权利要求2所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

获得背景特征信息,其中所述背景特征信息包括培养基类型和培养基颜色;和

基于所述背景特征信息确定所述鉴定的目标的形态。

6. 根据权利要求5所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

将所述目标特征和所述背景特征信息与储存在所述存储器中的目标特征和背景特征信息比较;并且

基于所述目标特征和所述背景特征信息确定微生物的类型。

7. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

通过分配极坐标至所述第一数字图像和所述第二数字图像中的每一个的像素将所述第一数字图像与所述第二数字图像对齐,使得所述第二数字图像中的像素的极坐标与所述第一数字图像中的相应像素的极坐标为相同的极坐标。

8. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

鉴定所述第一数字图像中为所述光学透明容器或者铺板培养基上的凝结的证据的像素信息;并且

从所述第一数字图像中的像素信息中减去归因于凝结的所述像素信息。

9. 根据权利要求8所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

在第一数字图像中鉴定凝结,对于所述第一数字图像,照明源向上指向所述光学透明容器的底部,并且

从所述第一数字图像减去那些具有低于预定阈值的光密度的像素的像素信息。

10. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

鉴定所述第一数字图像和第二数字图像的任一个中为灰尘的证据的像素信息;并且

从所述像素信息中减去归因于灰尘的所述像素信息。

11. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

获得所述接种的培养基的第三数字图像,其中所述第三数字图像在获取所述第一数字图像的时间和获取所述第二数字图像的时间之间的时间获得,其中在所述第一数字图像和第二数字图像的获得之间以及在所述第二数字图像和第三数字图像的获得之间,所述接种的培养基被从所述图像获取装置中移除并且放置在所述培育箱中;

将所述第三数字图像与所述第一数字图像对齐,使得所述第三数字图像中像素的极坐标与所述第一数字图像中相应像素的极坐标为相同的极坐标;

将所述第三数字图像和第二数字图像中的像素互相比较;以及

鉴定在所述第三数字图像和第二数字图像之间变化的像素。

12. 根据权利要求11所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

将所鉴定的目标中的至少一个与鉴定的在所述第三数字图像和第二数字图像之间变化的像素相关联。

13. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

获得所述接种的培养基的第三数字图像,其中在获得所述第二数字图像的时间之后获

得所述第三数字图像,其中在获得所述第二数字图像和第三数字图像的时间之间,将所述接种的培养基从成像仪器中移除并且放置在所述培育箱中;

将所述第三数字图像与所述第一数字图像和第二数字图像对齐,从而所述第三数字图像中像素的极坐标与所述第一数字图像和第二数字图像中相应像素的极坐标为相同的极坐标;

将所述第三数字图像和第二数字图像的像素互相比较;

鉴定在所述第二数字图像和第三数字图像之间变化的像素;以及

基于鉴定为已经变化的所述第二数字图像和第三数字图像中比较的像素,确定在所述第二数字图像中鉴定的目标在所述第三数字图像中已经变化。

14. 根据权利要求13所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

使用由所述第二数字图像鉴定的目标作为种子目标,由所述种子目标评估确定的变化的程度,由所述第二数字图像鉴定在所述第三数字图像中变化的目标。

15. 根据权利要求14所述的系统,其中所述一个或者多个处理器是可操作的以执行以下指令:

基于鉴定为在所述第二数字图像和第三数字图像之间已经变化的像素,更新所述存储器中与所述目标相关联的像素的坐标。

菌落对比度收集

[0001] 本申请是申请日为2016年4月22日、申请号为2016800229997、题为“菌落对比度收集”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求保护2015年4月23日提交的美国临时申请号62/151,681和2016年4月5日提交的美国临时申请号62/318,483的申请日的权益,其公开内容由此通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 对于检测微生物生长的培养板的数字成像的关注日益增加。用于检测微生物生长的成像平板的技术在PCT公开号W02015/114121中描述,其全文通过引用并入本文。使用这种技术,实验室人员不再需要通过直接目视检查来读板,而是可以使用高质量的数字图像用于板的检查。改变培养板的数字图像检查的实验室工作流程和决策制定也能提高效率。图像可通过操作者进行标定,用于操作者或者具有适当技能的另一个人员进行进一步检查(work-up)。附加图像也可被捕获并且用于指导二次处理。

[0005] 菌落的检测、菌落计数、菌落群体分化和菌落鉴定为现代微生物学成像系统限定了目标。尽可能早地实现这些目标达到了迅速将结果交付给病人并且经济地提供这些结果以及分析的目标。自动化实验室工作流程和决策制定可以改善可达到这些目标的速度和成本。

[0006] 尽管对于检测微生物生长的迹象的成像技术已经取得了显著的进步,但仍然在寻求扩展这种成像技术来支持自动化的工作流程。用于检查培养板来指示微生物生长的仪器和方法难以自动化,这部分地由于板检查的高度的视觉本质。在这方面,期望开发如此技术,其可自动地解读培养板图像,并在自动解读的基础上决定待执行的随后步骤(例如,菌落的鉴定、敏感性试验等)。

[0007] 例如,鉴定和区分培养板上的菌落可能是困难的,尤其是当菌落具有不同的尺寸和形状并且彼此接触时。当在板的一些区域生长已经达到汇合时,这些问题更加严重。由于这些原因,如果可能的话,优选在过程的早期鉴定菌落并且确定生长。然而,仍然需要用于孵育的时间,以允许至少菌落的一些生长。因此,一方面,允许菌落生长的越长,其开始与其背景以及互相之间形成的对比越强,并变得越容易鉴定它们。然而,在另一方面,如果允许菌落生长的太长久,并且其开始填充板和/或彼此接触,将其与其背景比较以及互相比较就变得更加困难。如果能够在菌落还足够小以彼此分离——尽管对比度相对较差——的孵育时间检测菌落,则该问题可以被最小化或者甚至得以解决。

[0008] 发明的内容

[0009] 本公开的一个方面涉及一种自动化方法,其用于评估铺板培养基上的微生物生长,所述方法包括:提供布置在基本上光学透明的容器内的用生物样品接种的培养基;在培育箱内孵育接种的培养基;将带有接种的培养基的透明容器放置在数字成像仪器内;在第一时间(t_0)获得接种的培养基的第一数字图像,所述第一数字图像具有多个像素;确定第

一图像内的像素相对于携带接种的培养基的容器的坐标;从数字成像仪器移除携带接种的培养基的容器,并且将接种的培养基放置在培育箱中用于进一步的孵育;进一步孵育后,将携带接种的培养基的容器放置在数字成像仪器内;在第二时间(t_x)获得接种的培养基的第二数字图像,所述第二数字图像具有多个像素;将第一数字图像与第二数字图像对齐,使得第二数字图像中的像素的坐标对应于第一数字图像中相应像素的坐标;将第二数字图像中的像素与第一数字图像中相应像素比较;鉴定第一数字图像和第二数字图像之间变化的像素,其中第一数字图像和第二数字图像之间没有变化的像素指示背景;确定第二数字图像中哪些鉴定的像素与指示背景的像素具有预定水平的阈值对比度;鉴定第二数字图像中的一个或者多个目标,每个目标由满足所述水平的阈值对比度的像素组成,并且其彼此不被背景像素隔开;对于所述鉴定的目标的至少一个,从所述目标的像素确定目标的形态;从所述目标的形态,确定所述目标是否是菌落候选;并且将与目标相关联的像素的坐标提供至存储器。

[0010] 在一些实例中,方法可进一步包括根据预定系列的照明条件,在第一时间获得多个第一数字图像,其中每个第一数字图像都在不同的照明条件下获得,每个照明条件包括携带接种的培养基的光学透明容器相对于照明源的指定的朝向,以及指定的背景颜色,在该指定的背景颜色上将光学透明容器放置在数字成像仪器内。指定的朝向可包括:照明源向下指向携带接种的培养基的光学透明容器的顶部;照明源向上指向携带接种的培养基的光学透明容器的底部;以及照明源指向携带接种的培养基的光学透明容器的侧面。对于指定的顶部和侧面朝向,指定的背景颜色可以是黑色。对于指定的底部朝向,指定的背景颜色可以是白色。照明条件可进一步包括指定的照明光谱,其包括发射红色波长的照明源;发射绿色波长的照明源;以及发射蓝色波长的照明源。

[0011] 在一些实例中,方法可进一步包括从与所述目标相关联的像素信息中获得目标特征,所述目标特征包括目标形状、目标大小、目标边缘和目标颜色中的至少一种,其中所述目标形态基于所述目标特征确定。目标颜色可由与目标相关联的像素的光谱特征确定。光谱特征可选自像素颜色、色调、照度和色度。也可以获得背景特征信息。背景特征信息可包括培养基类型和培养基颜色,并且目标形态可进一步基于背景特征信息确定。目标特征和背景特征信息可与储存在存储器中的其它目标特征以及其它背景特征信息比较,并且可基于目标特征和背景特征信息确定微生物的类型。

[0012] 在一些实例中,将第一数字图像与第二数字图像对齐可包括分配极坐标至第一和第二数字图像中的每一个的像素,使得第二数字图像中的像素的极坐标与第一数字图像中的相应像素的极坐标相同。同样,在一些实例中,可提供多种培养基,其用生物样品接种,布置在一个或者多个光学透明的容器中,在培育箱中孵育,并且在细菌生长的同时将其放置在数字成像仪器中,从而对每种培养基获得第一和第二数字图像。另外,在一些实例中,方法可进一步包括鉴定第一数字图像中为光学透明容器或者铺板培养基上的凝结的证据的像素信息,并且从图像中减去归因于凝结的像素信息。在数字图像中可鉴定为凝结的证据的像素信息,对于所述数字图像,照明源向上指向光学透明容器的底部,并且其中具有低于预定阈值的光密度的那些像素的像素信息被从图像中减去。

[0013] 在一些实例中,方法可进一步包括:鉴定第一和第二数字图像的任一个中为灰尘的证据的像素信息,并且从图像中减去归因于灰尘的像素信息。在数字图像中可鉴定为灰

尘的证据的像素信息,对于所述数字图像,光学透明容器包含白色培养基,照明源向下指向光学透明容器的顶部并且背景颜色是黑色的;光学透明容器包含有色的或者黑色的培养基,照明源向下指向光学透明容器的顶部并且背景颜色是白色的;或者照明源向上指向光学透明容器的底部。灰尘可能是任何培养基上的、光学透明容器上的或者数字成像仪器的光学部件上的灰尘。

[0014] 在一些实例中,方法可进一步包括:获得接种的培养基的第三数字图像,其中所述第三数字图像在获取第一数字图像的时间和获取第二数字图像的时间之间的时间获得,其中在第一和第二数字图像获取之间以及第二和第三数字图像获取之间,将所述接种的培养基被从数字成像仪器移除并且放置在培育箱中;将第三数字图像与第一数字图像对齐,使得第三数字图像中的像素的坐标与第一数字图像中相应像素的坐标相同;互相比对第三和第二数字图像中的像素;并且鉴定第三和第二数字图像之间变化的像素。第一和第三数字图像之间的孵育时间可等于第三和第二数字图像之间的孵育时间。所鉴定的目标中的至少一个可与鉴定的第三和第二数字图像之间变化的像素相关联。

[0015] 在一些实例中,方法可进一步包括:获得接种的培养基的第三数字图像,其中所述第三数字图像是在获得第二数字图像的时间之后获得的,其中在获得第二数字图像和第三数字图像的时间之间,将接种的培养基从数字成像仪器中移除并且放置在培育箱中;将第三数字图像与第一和第二数字图像对齐,使得第三数字图像中像素的坐标与第一和第二数字图像中相应像素的坐标相同;互相比对第三和第二数字图像的像素;鉴定第二和第三数字图像中变化的像素;并且基于鉴定为已经变化的第二和第三数字图像中比较的像素,确定在第二数字图像中鉴定的目标在第三数字图像中已经变化。在第二数字图像中鉴定的已被确定为在第三数字图像中变化的目标可被确定为种子目标,由该种子目标评估确定的变化的程度。在这样的情况下,方法可进一步包括基于鉴定为在第二和第三数字图像之间已经变化的像素,更新存储器中与目标相关联的像素的坐标。

[0016] 本公开的另一方面涉及一种方法,其用于鉴定已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长,所述方法包括:在培养基孵育的开始(t_0),获得培养基的第一数字图像,所述第一数字图像具有多个像素;分配坐标至所述第一数字图像的一个或者多个像素;在培养基的孵育时期后(t_x),获得所述培养基的第二数字图像,所述第二数字图像具有多个像素;将第二数字图像与第一数字图像对齐,其中所述对齐是基于分配至第一图像的像素的坐标以及分配至第二图像中相应于第一图像中分配了坐标的像素的一个或者多个像素的坐标;生成指示第二数字图像中局部的相邻像素之间变化的空间对比度数据;生成指示第一和第二数字图像的相应像素之间变化的时间对比度数据;对于第二数字图像的多个像素中的每一个,基于像素的空间对比度数据和时间对比度数据的结合,为像素分配对比度值;将具有大于预定阈值并且在彼此误差的预定界限内的对比度值的相邻像素相关联,所述相关联的像素构成鉴定的目标;并且在存储器中储存每个鉴定的目标作为候选菌落。

[0017] 在一些实例中,结合空间和时间的对比度数据包括平均空间和时间的对比度数据。空间和时间的对比度数据可根据加权平均进行结合。

[0018] 生成空间对比度数据可包括:在时间 t_x 获得多个图像,多个图像中的每一个是在不同的照明条件下获得的;处理多个 t_0 图像的每一个中的空间数据;并且结合所处理的空

间数据。处理空间数据可包括分别地处理每个照明条件的空间数据结果,并且从分别处理的空间数据结果选择最大的结果。

[0019] 生成时间对比度数据可包括:在时间 t_0 获得多个图像,多个图像中的每一个是在不同的照明条件下获得的;在时间 t_x 获得多个图像,在时间 t_x 的每个图像的照明条件对应于在时间 t_0 获得的图像的照明条件;处理相应的 t_0 和 t_x 图像的每个中的时间数据;并且结合处理的时间数据。处理时间数据可包括分别地处理每个照明条件的空间数据结果,并且从分别处理的时间数据结果选择最大的结果。

[0020] 在一些实例中,方法可进一步包括,对于给定的鉴定的目标:从与目标相关联的像素信息中获得多个目标特征,其中目标特征包括至少一个形态特征,所述形态特征为目标形状、目标面积、目标周长或者目标边缘中的至少一个;使用分类算法结合目标特征;将结合的目标特征与存储器中储存的多个微生物的目标特征信息比较;并且基于所述比较将鉴定的目标分类为微生物的类型。目标特征可进一步包括至少一个光谱特征,所述光谱特征为目标颜色、目标亮度、目标色调和目标色度中的至少一个,或者至少一个时间特征(时间特征为目标生长速率、目标颜色变化或者目标第一次可视地观察到的预测时间(projected time)中的至少一个)。目标特征中的至少一个可针对鉴定的目标的每个像素获得,并且随后使用一个或者多个统计直方图特征将其结合。分类算法可以是监督机器学习算法,其中可将结合的目标特征与存储器中储存的四种或者更少的微生物的目标特征信息比较。

[0021] 在一些实例中,方法可进一步包括,对于给定的鉴定目标:对于鉴定的目标中的每一个像素,基于像素的时间对比度数据分配时间对比度的值至像素;从分配的时间对比度的值中鉴定一个或者多个最大值;如果多于一个的最大值被鉴定,则确定所述最大值与共同的菌落形成单位相关联还是与不同的菌落形成单位相关联;并且对于确定为与不同的菌落形成单位相关联的任何两个最大值,至少部分地基于所述两个最大值的各自位置分割鉴定的目标为两个目标。确定两个最大值与共同的菌落形成单位相关联还是与不同的菌落形成单位相关联可进一步包括:对于每个最大值,确定从该最大值至鉴定的目标的边缘的距离;基于每个确定的距离和两个最大值之间的距离计算包含因子的值;并且将该包含因子的值与预定的范围比较,其中如果该包含因子的值小于预定的范围,则所述最大值与共同的菌落形成单位相关联,并且如果该包含因子的值大于预定的范围,则该最大值与不同的菌落形成单位相关联。如果该包含因子的值在预定的范围之内,则该方法可进一步包括:对于每个最大值,确定围绕该最大值的区域;并且计算围绕该最大值的各自区域的凸性,其中如果该凸性大于阈值,则该最大值与不同的菌落形成单位相关联。

[0022] 在一些实例中,方法可进一步包括,基于空间对比度数据鉴定时间上第一的数字图像中的一个或者多个目标;并且,对于时间上第二的数字图像中给定的鉴定的目标,如果时间上第二的数字图像中的目标的结合的空间和时间对比度数据与时间上第一的数字图像中鉴定的目标的空间对比度数据相匹配,则将第二数字图像中的目标分类为伪像。

[0023] 本公开的又另一个方面涉及一种方法,其用于评估已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长,所述方法包括:获得铺板培养基的第一和第二数字图像,每个数字图像都是在接种培养基的孵育时期之后并且在不同的时间获得的;将第二数字图像与第一数字图像对齐,其中所述对齐是基于分配至第一图像的像素的坐标以及分配至第二图像中相应于第一图像中分配了坐标的像素的一个或者多个像素的坐标;生成指示第一和第

二数字图像的相应像素之间的变化的时间对比度数据;从时间对比度数据鉴定第二数字图像中的目标;从时间对比度数据获得鉴定的目标的一个或者多个动态目标特征;基于一个或者多个动态目标特征将鉴定的目标分类为生物体的类型;并且在存储器中储存该鉴定的目标以及其分类。在一些实例中,一个或者多个动态目标特征可包括鉴定的目标的生长速率、鉴定的目标的色度特征(chromatic feature)的变化或者沿着大致上垂直于铺板培养基的轴的生长的变化。

[0024] 在一些实例中,方法可进一步包括:在接种的培养基的孵育时期后并且在与第一和第二数字图像不同的时间,获得铺板培养基的第三数字图像;将第三数字图像与第一和第二数字图像对齐;并且生成指示第二和第三数字图像的相应像素之间的变化的时间对比度数据,其中进一步基于所述时间对比度数据鉴定目标,并且其中鉴定的目标的一个或者多个动态目标特征包括时间对比度数据的二阶导数。该一个或者多个动态目标特征可包括目标生长的加速率。

[0025] 本公开的又进一步方面涉及计算机可读存储介质,其具有配置为引起处理器实施方法的在其上编码的程序指令。该方法可以是用于评估铺板培养基上的微生物生长、鉴定已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长、或评估已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长的上述的方法中的任一种。

[0026] 本公开的甚至进一步方面涉及一种系统,其用于评估用生物样品接种的培养基中的生长。所述系统包括用于捕获培养基的数字图像的图像获取装置、存储器、以及可操作地执行指令以实施方法的一个或者多个处理器。在一些实例中,存储器可以储存关于捕获的数字图像的信息,并且通过执行的指令实施的方法可以是用于评估铺板培养基上的微生物生长的上述的方法中的任一种。在其它实例中,存储器可以储存关于在捕获的数字图像中鉴定的候选菌落目标的信息,并且通过执行的指令实施的方法可以是用于鉴定已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长的上述的方法中的任一种。在又进一步的实例中,存储器可以储存关于在捕获的数字图像中鉴定的一个或者多个目标以及所鉴定的目标的一个或者多个分类的信息,并且通过执行的指令实施的方法可以是用于评估已经用培养物接种并且孵育的铺板培养基上的微生物生长的上述的方法中的任一种。

附图说明

[0027] 图1是根据本公开的一个方面的用于成像分析和测试培养物的示意图。

[0028] 图2是图解根据本公开的一个方面的用于成像分析和测试培养物的自动化实验室工作流程程序的流程图。

[0029] 图3A、3B和3C是根据本公开的一个方面的通过可视化表示菌落形态来示出菌落形态随时间变化的时间对比度的图像。

[0030] 图3D和3E是示出了在不同的照明条件下的空间对比度的图像。

[0031] 图4是根据本公开的一个方面的用于获得和分析图像信息的实例程序的流程图。

[0032] 图5是根据本公开的一个方面的用于获得空间对比度的实例程序的流程图。

[0033] 图6是根据本公开的一个方面的用于获得时间对比度的实例程序的流程图。

[0034] 图7是根据本公开的一个方面的用于从图像中滤除伪像的实例程序的流程图。

[0035] 图8是根据本公开的一个方面的用于标记图像的像素的实例程序的流程图。

- [0036] 图9是根据本公开的一个方面的用于拆分菌落为单独的目标的实例程序的流程图。
- [0037] 图10是根据本公开的一个方面的实例目标分割程序的流程图。
- [0038] 图11是示出了测量汇合的菌落的示意图,其作为图10中分割程序的一部分。
- [0039] 图12是根据本公开的一个方面的Voronoi图。
- [0040] 图13A、13B和13C是图解根据本公开的一个方面的隔离因子测量的图。
- [0041] 图14是图解根据本公开的一个方面的影响的Voronoi区域的图解。
- [0042] 图15A、15B和15C是图解根据本公开的一个方面的菌落生长的表征的图像。
- [0043] 图16A和16B示出了成像平板的一部分,具有图像中样品菌落的放大和重定向的图像。
- [0044] 图16C示出了图16B中的各自图像的矢量图。
- [0045] 图17描绘了根据本公开的一个方面的样本的SHQI、空间对比度和时间对比度图像。
- [0046] 图18是比较图2中的程序的时间线 (timeline) 与可比较的手动进行的程序的时间线的流程图。

具体实施方式

[0047] 本公开提供了用于至少部分地基于铺板培养基的一个或者多个数字图像中检测的对比度来鉴定和分析铺板培养基上的微生物生长的仪器、系统和方法。本文描述的多个方法可完全地或者部分地自动化,例如被集成为完全或者部分地自动化的实验室工作流程的一部分。

[0048] 本文描述的系统能够在用于对微生物样品成像的光学系统中实行,用于鉴定微生物以及检测这类微生物的微生物生长。有许多这样的可商业上获得的系统,本文对此没有详细描述。一个实例是BD Kiestra™ ReadA紧凑型智能孵育和成像系统。其它的实例系统包括在PCT公开号W02015/114121以及美国专利公开号2015/0299639中描述的那些,它们的全文通过引用并入本文。这样的光学成像平台对本领域技术人员来说是熟知的,在此不再详细描述。

[0049] 图1是具有处理模块110以及用于提供铺板培养基的高质量成像的图像获取装置120 (例如,摄像机) 的系统100的示意图。处理模块和图像获取装置可进一步连接至其它系统部件,并且由此进一步与其它系统部件相互作用,所述其它系统部件例如用于孵育铺板培养基以使得接种在铺板培养基上的培养物生长的培育箱模块(未示出)。这样的连接可以采用轨道系统完全地或者部分地自动化,所述轨道系统接收用于孵育的样本,并且将其输送至培育箱,以及随后在培育箱和图像获取装置之间输送。

[0050] 处理模块110可根据多种类型信息的处理,来指示系统100的其它部件执行任务。处理器110可以是执行一个或者多个操作的硬件。处理器110可以是任何标准的处理器,例如中央处理单元(CPU),或者可以是专门的处理器,例如专用集成电路(ASIC)或者现场可编程门阵列(FPGA)。尽管示出了一个处理器块,但系统100也可以包括多个处理器——其可以或者不可以并行操作,或者其它的专用逻辑和存储器,用于储存和追踪与培育箱和/或图像获取装置120中的样品容器相关的信息。在这点上,处理单元可追踪和/或储存与系统100中

的样本相关的数个类型的信息,包括但不限于样本在系统中的位置(培育箱或者图像获取装置,在其中的位置和/或朝向,等等)、孵育时间、捕获的图像的像素信息、样品的类型、培养基的种类、预防性处理信息(例如,有害的样本)等等。在这点上,处理器可以能够将本文描述的多种程序全部或者部分自动化。在一个实施方式中,用于实施本文描述的程序的指令可储存在非临时计算机可读介质(例如,软件程序)上。

[0051] 图2是一个流程图,其示出了用于成像、分析以及任选地测试培养物的实例自动化实验室程序200。程序200可通过自动化微生物实验室系统实行,例如BD Kiestra™总实验室自动化(Total Lab Automation)或者BD Kiestra™工作间自动化(Work Cell Automation)。实例系统包括相互连接的模块,每个模块配置为执行程序200中的一个或者多个步骤。

[0052] 在202,提供培养基并且用生物样品接种。培养基可以是光学透明的容器,从而在生物样品被从不同的角度照明时,可以在容器内被观察。接种可遵循预定的模式。用于将样品划线在平板上的划线模式以及自动化方法是本领域技术人员所熟知的,在此不再详细讨论。一种自动化的方法采用磁控珠将样品划线在平板上。在204,培养基被孵育,以允许生物样品生长。

[0053] 在206,捕获培养基和生物样品的一个或者多个数字图像。如下文中将要更详细描述,在孵育过程期间,培养基的数字成像可被实施多次(例如,在孵育开始时、在孵育中间的时间、在孵育结束时),从而可观察并且分析培养基的变化。培养基的成像可包括从培育箱中移除培养基。培养基的多个图像在不同时间被拍摄时,在成像工作段(session)之间,培养基可被送回培育箱中用于进一步孵育。

[0054] 在208,基于来自捕获的数字图像的信息,对生物样品进行分析。数字图像的分析可包括图像中包含的像素信息的分析。在一些示例中,像素信息可以在逐像素基础上进行分析。在其它示例中,像素信息可在逐块基础(block by block basis)上进行分析。在进一步的示例中,像素可基于像素的整个区域进行分析,由此通过结合单独像素的信息、选择样品像素或者通过使用其它的统计方法例如下文中将要更详细描述的统计直方图操作,区域中单独像素的像素信息可被得出。在本公开中,被描述为应用于“像素”的操作同样地可用于块或者其它像素分组,并且术语“像素”因而旨在包括这样的应用。

[0055] 分析可包括确定是否检测到在培养基中生长。从图像分析的角度,可以通过鉴定成像的目标(基于目标和其相邻的环境之间的差异)并且随后鉴定该目标随着时间的变化,从而在图像中检测生长。如本文中更详细描述的,这些差异和变化都是两种形式的“对比度”。除了检测生长之外,在208处的图像分析可进一步包括定量检测的生长量、鉴定独特的菌落、鉴定姐妹菌落等。

[0056] 在210,确认生物样品(特别是,鉴定的姐妹菌落)是否呈现数量上地显著生长。如果发现没有生长或者发现微不足道数量的生长,则程序200可进行至220,在这里输出最终报告。在从210进行至220的情况中,最终报告将可能指示缺乏显著的生长,或者报告正常菌群的生长。

[0057] 如果确定该生物样品展现出数量上地显著增长,则在212,基于现有的分析,可以从图像中挑取一个或者多个菌落。挑取菌落可以是完全自动化的过程,其中每个挑取的菌落都被采样和检测。可选地,挑取菌落可以是部分自动化的过程,其中多个候选菌落被自动

鉴定并且在数字图像上视觉地呈现给操作者,从而操作者可以输入对一个或者多个候选的选择,用于采样以及进一步测试。选择的和挑取的菌落的采样本身可以由系统自动进行。

[0058] 在214,准备采样菌落用于进一步测试,例如通过将样品铺板在生物体悬液中。在216,使用基质辅助激光解吸电离(MALDI)成像测试样品,以鉴定从初始培养基中取样的样本的类型。在218,样品还要,或者任选地,进行抗生素敏感测试(AST),以鉴定对所鉴定样本的可能处理。

[0059] 在220,测试结果在最终报告中输出。报告可包括MALDI以及AST结果。如上文所述,报告还可指示样本生长的量化。因此,自动化系统能够从接种的培养基开始,并且生成关于在培养物中发现的样本的最终报告,而很少或者没有额外的输入。

[0060] 在程序如图2的实例程序中,检测的以及鉴定的菌落通常被称为菌落形成单位(CFU)。CFU是作为一种或者几种细菌开始的微观目标。随着时间的推移,细菌生长形成菌落。从当细菌被放置在平板上时,时间越早,检测到的细菌越少,因此菌落越小并且与背景的对比度越低。换言之,较小的菌落尺寸产生较小的信号,并且在恒定背景上较小的信号导致较小的对比度。这由下面的等式反映:

$$[0061] \quad (1) \text{ 对比度} = \frac{\text{信号} - \text{背景}}{\text{信号} + \text{背景}}$$

[0062] 对比度在鉴定图像中的目标例如CFU或者其它伪像中发挥重要的作用。如果目标在亮度、颜色和/或纹理(texture)上与其周围具有显著的差异,则目标可被检测到。一旦目标被检测到,分析还可包括鉴定检测到的目标的类型。这样的鉴定也可以依靠对比度测量,例如鉴定的目标的边缘的平滑性,或者目标的颜色和/或亮度的均匀性(或者缺少均匀性)。为了被图像传感器检测到,该对比度必须足够大以克服图像噪声(背景信号)。

[0063] 人类对对比度的感知(由韦伯定律决定)是有限的。在最佳条件下,人的眼睛可检测1%的光水平差异。图像测量的质量和置信度(例如,亮度、颜色、对比度)可由测量的信噪比(SNR)来表征,其中独立于像素强度,100的SNR值(或者40分贝)将匹配人的检测能力。甚至当那些菌落仍然对人眼不可见时,利用高SNR成像信息和已知的每个像素的SNR信息的数字成像技术可允许检测到菌落。

[0064] 在本公开中,可以以至少两种方式收集对比度:空间上的和时间上的。空间对比度或者局部对比度量化单个图像中给定区域(例如,像素、相邻像素的组)与其周围之间在颜色或者亮度上的差异。时间上的对比度或者时间对比度,量化一个图像中给定区域与在不同时间拍摄的另外一张图像中相同区域之间在颜色或者亮度上的差异。控制时间对比度的等式与用于空间对比度的等式相似:

$$[0065] \quad (2) \text{ 时间对比度} = \frac{|\text{信号}(t_0) - \text{信号}(t_1)|}{\text{信号}(t_0) + \text{信号}(t_1)}$$

[0066] 其中 t_1 是 t_0 后的时间。给定图像的空间和时间对比度都可用于鉴定目标。鉴定的目标可随后被进一步测试来确定它们的重要性(例如,它们是否是CFU、正常的菌群、灰尘等)。

[0067] 图3A、3B和3C提供了时间对比度对于成像样品可具有的影响的视觉演示。图3A中示出的图像是在不同的时间点(从左到右,从顶排至底排)捕获的,示出了样品中的总生长。虽然图3A中的生长是显著的,但是从图3B的相应对比度时间图像中,生长甚至更显著,并且

甚至可在序列中更早地被注意到。为清楚起见,图3C示出了图3B中放大的部分。从图3C中可以看到,菌落的部分被成像的时间越长,在对比度图像中使得光斑就越亮。以这种方式,每一个菌落的质心可由菌落的明亮中心或者峰来指示。因此,随着时间推移获得的图像数据可以揭示关于菌落形态变化的重要信息。

[0068] 为了最大化目标相对于其背景的空间或时间对比度,系统可在不同的背景上使用不同的入射光来捕获图像。例如,任意的顶部光照、底部光照或者侧面光照可用在黑色或者白色背景任一种之上。

[0069] 图3D和3E提供了光照条件对于成像样本可具有的影响的视觉演示。图3D中的图像是使用顶部光照捕获的,而图3E中的图像是在几乎相同的时间(例如,时间足够接近,没有可注意到的或者显著的生长发生)使用底部光照捕获的。如可以看到的,图3D和3E中的样品的图像中的每一个包含数个菌落,但是可见的关于菌落的另外信息(在这种情况下,溶血)需要图3D中的图像的背面光照或者底部光照,而在图3E的图像中,相同的信息很难被掌握。

[0070] 在给定的时间点,可在多个照明条件下捕获多个图像。可使用不同的光源捕获图像,由于照明光的水平、照明角度和/或在目标和传感器之间部署的滤光器(例如,红色、绿色和蓝色滤光器),不同的光源是光谱上不同的。以这种方式,图像获取条件在光源位置(例如,顶部、侧面、底部)、背景(例如,黑色、白色、任何颜色、任何强度)以及光谱(例如,红色通道、绿色通道、蓝色通道)方面是可变的。例如,第一图像可使用顶部照明以及黑色背景捕获,第二图像可使用侧面照明以及黑色背景捕获,并且第三图像可使用底部照明以及没有背景(即白色背景)捕获。而且,为了最大化空间对比度,可以使用特定的算法来产生一组不同的图像获取条件。通过根据给定的序列和/或在一段时间跨度内来改变图像获取条件,这些或者其它算法对最大化时间对比度也是有用的。一些这样的算法在PCT公开号W02015/114121中描述。

[0071] 图4是一个流程图,其示出了至少部分地基于对比度来分析成像平板的实例程序。图4的程序可被看做是图2的程序200的实例子程序,从而图2的206和208至少部分地使用图4的程序来进行。

[0072] 在402,在时间 t_0 捕获第一数字图像。时间 t_0 可以是孵育过程开始后不久的时间,从而成像平板中的细菌尚未开始形成可见的菌落。

[0073] 在404,为第一数字图像中的一个或者多个像素分配坐标。在一些情况下,坐标可以是极坐标,其具有从成像平板的中心点延伸的径坐标以及围绕中心点的角坐标。坐标在后面的步骤中被使用来帮助将第一数字图像与在不同的角度和/或在不同的时间拍摄的平板的其它数字图像对齐。在一些情况下,成像平板可以具有特定的标志(landmark)(例如,偏离中心的点或者线),从而覆盖第一图像中标志的像素(一个或多个)的坐标可以被分配给覆盖其它图像中相同标志的像素(一个或多个)。在其它情况下,图像本身可被认为是用于进一步对齐的特征。

[0074] 在406,在时间 t_x 捕获第二数字图像。时间 t_x 是 t_0 后的时间,此时成像平板中的细菌有机会形成可见的菌落。

[0075] 在408,基于之前分配的坐标,将第二数字图像与第一数字图像对齐。对齐图像可进一步包括图像的归一化和标准化,例如,使用PCT公开号W02015/114121中描述的方法和系统。

[0076] 在410,确定第二数字图像的对比度信息。对比度信息可在逐像素基础上进行收集。例如,第二数字图像的像素可与第一数字图像的对应像素(处于相同的坐标)比较,以确定时间对比度的存在。另外,第二数字图像的相邻像素可互相比较,或者与已知为背景像素的其它像素比较,来确定空间对比度的存在。像素颜色和/或亮度的变化指示对比度,并且从一个图像至下一个图像或者从一个像素(或者像素的区域)至下一个像素(或者像素的区域)的这种变化的大小可被测量、计算、估计或者以其它方式确定。在给定图像的时间对比度和空间对比度二者都被确定的情况下,基于给定像素的空间和时间对比度的结合(例如,平均、加权平均),可确定图像的给定像素的总对比度。

[0077] 在412,基于在410计算的对比度信息,鉴定第二数字图像中的目标。具有相似对比度信息的第二数字图像的相邻像素可被认为属于同一目标。例如,如果相邻像素与其背景之间或者像素之间亮度的差异,和它们在第一数字图像中的亮度是基本上相同的(例如,在预定的阈值量内),则像素可被认为是属于同一目标。作为一个示例,系统可分配“1”至具有显著对比度(例如,超过阈值量)的任意像素,然后鉴定所有分配“1”的相邻像素的组为目标。该目标可被给予特定的标记或者掩模,从而具有相同标记的像素共享某些特性。该标记可在子程序400的随后过程期间帮助将目标与其它目标和/或背景区分开。鉴定数字图像中的目标可包括分割或者划分数字图像为多个区域(例如,前景和背景)。分割的目的是将图像改变为多个组成部分的表示,以便更容易地分析组成部分。图像分割用于定位图像中感兴趣的目标。

[0078] 在414,给定目标的特征(在412鉴定)可以被表征。目标特征的表征可包括导出目标的描述性统计(例如,面积、反射比、大小、光密度、颜色、平板位置等)。描述性统计可最终定量地描述收集的关于目标的信息集合的某些特征(例如,从SHQI图像、从对比度图像)。这样的信息可作为种类、浓度、混合物、时间和培养基的函数进行评估。然而,至少在一些情况下,表征目标可从与目标特征相关的定性信息的集合开始,由此,这些定性信息随后被定量地表示。下面的表1提供了可定性评估并且随后转化为定量表示的实例特征的列表:

[0079] 表1:目标的定性属性和定量地转化该属性的标准

编号	特征	分数	标准
[0080]	1	0	没有生长
		1	生长
	2	n/a	以小时记录时间
	3	1	<1 mm
		2	>1-4 mm
		3	>4 mm
	4	1	<1 mm
		2	> 1-2 mm
		3	>2 mm
	5	1	灰色/白色
		2	玫瑰色-粉色
		3	无色
		4	红色
		5	蓝色
		6	蓝色-绿色
		7	棕色
		8	浅黄色至黄色

[0081]	6	溶血	9	绿色
			0	无
			1	小 β (<1 mm)
			2	大 β (>1 mm)
			3	α
	7	形状	1	凸的
			2	平的
			3	铺展的
			4	凹的
	8	表面/边缘	1	光滑的
			2	粗糙的
			3	粘液状的
			4	有足的(feet)

[0082] 目标的一些特征,例如形状或者直到它被可视观察的时间,可将目标作为一个整体单次测量。其它的特征可以被多次测量(例如,对于每个像素、对于具有共同的Y坐标的每一行像素、对于具有共同的X坐标的每一列像素、对于具有共同的角坐标的每一射线(ray)像素、对于具有共同的径坐标的一圈(circle)的像素)并且随后例如采用直方图结合为单一测量。例如,可对于每个像素测量颜色,对于每一行、每一列、每一射线或者每一圈的像素测量生长速率或者大小,等等。

[0083] 在416,基于表征的特征确定目标是否为菌落候选。菌落候选确定可包括输入定量的特征(例如上文中表1中示出的分数)或者其子集至分类器。分类器可包括用于实施监督机器学习算法的混淆矩阵(confusion matrix),或者用于实施非监督机器学习算法的匹配矩阵,以评估该目标。监督学习在这样的情况下是优选的:其中将目标与有限集(例如,两个或者三个)的可能的生物体区分(在这种情况下可在相对有限集的训练数据上训练算法)。相反,非监督学习在这样的情况下是优选的:其中将目标与可能的生物体的整个数据库区分,在这种情况下提供全面的——或者甚至是充分的——训练数据是困难的。是在混淆或者匹配矩阵的情况下,可在一定范围内数值上测量差异。例如,对于给定的一对目标,“0”可能意味着两个目标应当相互区分,而“1”可能意味着目标难以互相区分。

[0084] 菌落候选可被储存在自动化系统的存储器中用于进一步的应用(例如,测试、下文中描述的分割程序等)。

[0085] 多种培养基的应用

[0086] 在上文的实例中,培养物的评价是针对单一培养基描述的。然而,实例同样适用于其中在多种培养基中评价培养物的示例。

[0087] 由于细菌的特性(例如,颜色、生长速率等)可能依赖于使用的培养物培养基(“培养基”)的类型而变化,所以在分类期间(例如,子程序400的416),可将不同的混淆矩阵用于每种培养基。因此,对于两个目标,对一种培养基,分类器可能输出“0”,而对于相同两个的目标,对不同的培养基,分类器可能输出“1”,这是完全合理的。分类器的集合结果可以随后一起评估(手动或者基于进一步机器驱动的关系),从而达到目标的总的或最终的区分或者分类。

[0088] 多种培养基的评估可使用单个容器来实行。该单个容器可配置为保存多种培养基(例如,双板、三板、四板等)从而多种培养基可同时一起成像。可选地,可通过将培养样品划线在数个容器中,来评估多种培养基,每个容器保存一种或者多种培养基。多个容器中的每

一个可然后进行上述的成像程序。从每种培养基获得的信息(例如,表征的特征)可随后被集合地输入分类器,以便对不同培养基内发现的(spotted)生长给出更加知晓的(informed)鉴定。

[0089] 对比度信息

[0090] 图5是流程图,其示出了作为图4中410的一部分的用于获得空间对比度的实例子程序500。子程序500接收下列作为输入:一组的一个或者多个背景以及光照条件551以及滤光器554。在502,在来自输入组551的指定的光照和背景条件下获得数字图像。在504,然后,图像被复制(clone)。在506,使用滤光器554对复制的图像之一滤光。在图5的实例中,低通内核被用作滤光器,但是技术人员知道可使用的其它滤光器。在508,计算未滤光的图像减去滤光的图像与滤光的图像加未滤光的图像的比率。在510,基于508计算的比率获得空间对比度图像。该程序500可针对每个背景和光照条件551重复。程序500的每次重复产生另一个空间对比度图像,其可在510用于迭代地更新之前储存的空间对比度图像。因此,全面的对比度图像(包括来自每个照明条件的对比度)可以迭代地建立。在一个实施方式中,在每次迭代中,清楚的对比度图像——其中对比度设置仍然设置为0(与迭代建立的对比度图像相比)——可被提供作为每个照明设置的输入。如果在512确定最后的图像已被处理,则程序500结束。

[0091] 图6是流程图,其示出了同样作为如图4中410的一部分的用于获得时间对比度的实例子程序600。子程序600接收下列作为输入:一组的一个或者多个背景以及光照条件651;以及滤光器655。在602,获得在指定的光照和背景条件下拍摄的第一和第二数字图像的每一个。在604, t_0 图像被滤光。在图6的实例中,采用低通内核作为滤光器,但是技术人员知道可使用的其它的滤光器。在606,计算未滤光的 t_x 图像减去滤光的 t_0 图像与滤光的 t_0 图像加未滤光的 t_x 图像的比率。在608,基于606计算的比率获得时间对比度图像。该程序600可在不同的照明条件和/或不同的背景条件下重复。程序600的每次重复产生另一个时间对比度图像,其可在608用于迭代地更新之前储存的时间对比度图像。与空间对比度图像的建立一样,时间对比度图像可迭代地建立,其中清楚的对比度图像被提供作为每个照明条件的输入。如果在610确定最后的图像已被处理,则程序600结束。

[0092] 为了得到关于对比度的全面的或者总体的确定,空间和时间对比度结果可进一步结合。空间和时间对比度的结合在本文被称作“混合对比度”(MC)。在一个实施方式中,可从时间 t_0 的空间对比度(SC)图像、时间 t_x 的空间对比度图像以及从 t_0 和 t_x 图像的比较得到的时间对比度(TC)图像,根据如下等式得到混合对比度:

[0093] (3)
$$MC^{(t_0, t_x)} = \frac{TC^{(t_0, t_x)} + (SC^{t_x} - SC^{t_0})}{2}$$

[0094] 滤光

[0095] 为了增强图像分析,在图4的子程序400中可包括另外的过程。例如,可分析第一数字图像寻找在时间 t_0 出现在图像中的目标。由于已知在 t_0 还没有细菌开始显著地生长,所以可以假定在时间 t_0 发现的任何目标仅仅是不会构成菌落候选的灰尘、气泡、伪像、凝结等。

[0096] 可对捕获的图像使用一个滤光过程,以减去附着在成像平板或者镜头上的灰尘和其它伪像。当考虑透明培养基(例如,麦康凯琼脂、CLED琼脂、显色琼脂(CHROMagar)等)时,

可预期一些水平的灰尘会存在于捕获的图像上。灰尘对给定图像的影响可至少部分地由拍摄图像的具体光照和背景条件决定。例如,当使用白色培养基时,在下面采用黑色背景并且从上面照明培养基时,反射伪像和灰尘会最容易被观察到。作为另一个进一步的实例,当使用有色或者黑色培养基时,在下面采用白色背景从上面照明培养基时,伪像和灰尘将会最容易被观察到。作为进一步的实例,在大多数的任意培养基中,不考虑背景,当从下面照射培养基时,吸收光的伪像和灰尘将被观察到。在任何情况下,灰尘和伪像的管理是复杂的图像处理挑战,其可以显著地影响微生物生长的检测。

[0097] 灰尘和伪像可被分为两种类型:(A)能够改变位置的那些;和(B)不能改变位置的那些。灰尘和伪像可随着时间积累,这意味着类型A和B二者的数量都可随着时间变化。尽管如此,观察显示在数量上类型A比类型B更容易随时间变化。当然,类型A也更容易变化,例如由于平板被移入或者移出成像室。

[0098] 通常,类型B是由与平板本身关联的伪像例如墨点(在平板下方印刷的品牌、批号和信息)、与塑料模具注入点关联的瑕疵或者磨砂区域(frosted region)引起的。类型B也可以是由粘在培养基的顶部的、陷在培养基内的或者静电粘在平板下侧的灰尘或者气泡引起的。

[0099] 从观察的成像点看,甚至类型A的灰尘和伪像本身几乎不会位置改变。然而,由于平板的塑料和培养基充当滤光器和镜头的原因,观察到的类型A的伪像的特性和位置可能轻微变化,这取决于培养基颜色、培养基水平以及塑料。类型B的灰尘和伪像也不会改变位置。但是,就类型B的灰尘和伪像连接到培养基并且培养基随着时间遭受轻微运动和漂移(主要是因为在培育箱中随着时间轻微干燥的原因)而言,类型B的灰尘和伪像可随着培养基移动。因此,类型B的灰尘和伪像的位置也至少在一定程度上容易细微地变化。

[0100] 在对比度方面,类型A的灰尘的颗粒(speck)可以说是在 t_0 空间对比度图像中的位置“ p_0 ”处存在,并在在 t_x 空间对比度图像中的位置“ p_x ”处存在。假定 p_0 和 p_x 是不同的位置,则灰尘或者伪像也将在时间对比度图像中的两个位置处存在(例如,在 p_x 位置显示为正对比度,在 p_0 位置显示为负对比度)。通过比较,类型B的灰尘的颗粒将在时间 t_0 和 t_x 的两个空间对比度图像的共同位置中存在,而在时间对比度图像中不存在。

[0101] 如上所解释的,为了得到混合对比度结果,可以把空间和时间对比度图像结合。类型A和B二者的灰尘和伪像的影响可进一步从混合对比度结果中消除。在一个实施方式中,如果目标(例如,CFU候选)在混合对比度结果中被鉴定,则可将其与在时间 t_0 的空间对比度结果中检测到的目标邻域(neighborhood) $N(x, y)$ 的灰尘和伪像比较。然后,如果类似的目标在时间 t_0 的空间对比度结果中被发现,则在混合对比度结果中鉴定的目标被标记为A类型或者B类型假阳性。即使最初目标没有被标记为A类型或者B类型假阳性,如果随着时间的变化发现目标没有显著地改变大小,则仍然可能稍后确定目标为B类型假阳性。假阳性可被储存,并且稍后被应用于随后的图像中,例如通过下文进一步描述的滤光掩模(例如,二元掩模)。

[0102] 另一种滤光过程可用于减去在平板上形成的凝结(例如,在孵育工作段开始时从冰箱转移到培育箱期间)。在一个实例凝结滤光器中,平板使用底部光照来照明,从而与没有凝结的位置相比,更少的光透过凝结的位置。可随后评估图像的光密度,低光密度的区域会从图像中减去。

[0103] 另外地或者可选地,图像掩模可被构造以从 t_0 图像和/或随后的数字图像的任何分析中忽略(discount)目标。图7是流程图,其示出了使用 t_0 图像的空间对比度产生图像掩模的实例程序700。在程序700的实例中,提供的仅有输入是在时间 t_0 拍摄的SHQI图像751。在702,确定 t_0 图像的空间对比度。在704,使用空间对比度信息收集关于 t_0 图像的感兴趣区域中像素的统计信息,例如平均值和标准差(例如,关于亮度的)。在706,调整对比度阈值以保证适当数量的像素超过该阈值。例如,如果高过给定百分比的像素不被视为图像的背景,则阈值可以增大。在步骤708,基于阈值下的那些像素相关的统计信息,进一步调整阈值。最后,在710,生成二元掩模。二元掩模对非有效像素的多个伪像和其它被认为有效的像素进行区分。二元掩模然后可以在后续的时间使用,此时存在潜在的菌落进行检测,并且从候选菌落中排除占据了非有效像素的目标。

[0104] 上述的滤光过程通过避免偶然包括灰尘、凝结或者其它伪像作为目标并且在414加快性质表征——因为这样的表征可只对于有效像素实施——可以改进子程序400。

[0105] 限定目标和标记

[0106] 另外一个可加入图4的子程序400的过程是分配标记至在412鉴定的目标。目标可被给予特定的标记,使得具有相同标记的像素共享某些特性。标记可在子程序400的随后过程期间帮助将目标与其它目标和/或背景区分。图8是流程图,其示出了用于标记在时间 t_x 拍摄的图像(或者“ t_x 图像”)的像素的实例程序800。在图8的实例中,接收二元掩模851(例如,程序700的输出)、 t_x 图像的未初始化的候选掩模852以及时间对比度图像853(例如,子程序600的输出)作为输入。在802,候选掩模852被初始化。初始化可包括鉴定成像平板上感兴趣的区域,以及使用二元掩模851鉴定在时间 t_x 拍摄的图像中的“有效像素”。有效像素是没有被作为候选菌落忽视的,并且将被考虑进行标记的成像的像素。在804,使用时间对比度图像853来收集关于 t_x 图像的感兴趣区域中的有效像素的统计信息,例如平均值和标准差(例如,关于亮度的)。然后,在806,时间对比度图像853和二元掩模851的每一个的统计信息(其优选在相似的光照和背景条件下生成)被结合以形成阈值对比度图像。使用由阈值对比度图像限定的阈值, t_x 图像的“连通(connex)组成部分”在808被标记。连通组成部分有效地作为指示相邻像素(或者相邻像素内的分组)之间连接的标记,其又表明该像素是相同目标的一部分。

[0107] 一旦对 t_x 图像已经限定连通组成部分,每个连通组成部分可被单独地分析(在810),以作为单一目标验证其状态。在图8的实例中,与标记相关联的像素的统计计算在812进行。计算可利用直方图来确定像素的亮度或者颜色的平均值和/或标准差。在814,确定像素是否满足阈值面积(threshold area)。如果不满足阈值面积,则操作进行到830,在那里更新标记。更新标记可包括保持所分析的组成部分为一个标记,或者将组成部分分成两个标记。在阈值面积不被满足的情况下,组成部分保持为单个标记。如果满足阈值面积,则在816,平滑直方图,并且在818,鉴定分布式标记像素的峰。峰可通过具有最小面积来进一步限定——由于小于该最小面积的峰可以忽略不计。

[0108] 在820,对鉴定的峰的数量进行计数。如果只有一个峰,则操作进行到830,并且更新标记,从而该组成部分保持为一个目标。如果存在多于一个峰,则在824,使用阈值对比度图像进一步评估峰之间的对比度是否为显著的。然后操作进行到830,并且基于多个鉴定的峰更新标记,从而该组成部分中显著的对比度结果被分成二个,并且否则保持为一个。

[0109] 分割(segmentation)

[0110] 可以被包括作为子程序400的一部分的另一过程是分割过程,其用于将在时间 t_x 的汇合菌落分开为单独的目标。如果在时间 t_x ,菌落已经生长到其重叠或者互相接触的点,为了评估区域内单独的菌落,可能需要穿过汇合区域绘制边界。

[0111] 在一些情况下,在两个接壤的菌落具有不同的特征(例如,不同的颜色,不同的纹理)时,分割可简单地包括对汇合区域的特征分析。然而,空间和时间对比度不总是足以单独地鉴定菌落之间的边界。图9是流程图,其示出了用于将这样的菌落分开为单独的目标(例如,采用单独的标记),或者换句话说,分割菌落的实例程序900。图9的实例程序900使用在时间 t_0 拍摄的第一数字图像951、在时间 t_x 拍摄的第二数字图像以及 t_0 图像二元掩模953(例如,由程序700生成的掩模)作为输入。在902,基于 t_0 和 t_x 图像951和952生成时间对比度图像。在904,使用二元掩模953分割时间对比度图像。在906,将标记运用于图像的分割部分。在908,鉴定每个标记的峰或者最大值。给定的分割部分的最大值通常为分割部分的中心点或者质心。在910,对于每个标记,最大值(例如所分析的标记的、相邻标记的)用于进行关于下述的进一步确定:是否给定的标记对其相邻的是独特的,或者是否应当与一个或者多个相邻标记进行结合。一旦标记被消减至其独特的组成部分,对每个标记的特征表征(例如,程序400的步骤414和416)可在912执行,并且在914生成候选菌落的全局列表。

[0112] 可运用多种因子,例如包含因子(inclusion factor),以确定给定标记的局部最大值属于一个菌落还是不同的菌落。包含因子是指示相邻像素是否与相邻目标相关联的因子。这样的因子可在分割策略中使用来确定是将在给定标记中的两个局部最大值分裂为两个单独的目标还是将它们合并为单一目标。

[0113] 图10是示出了这样的实例分割策略的流程图。程序1000可用作图9中步骤910的子程序。如图10中所示的,鉴定两个局部最大值1051和1052。在1002,对于每个最大值,鉴定周围区域。在图10的实例中,区域“A”围绕最大值1051,并且区域“B”围绕最大值1052。出于下文的实例等式的目的,假定区域A的大小为大于或者等于区域B。在一些情况中,每个区域可给定为椭圆形状,其具有沿着区域的水平轴的水平距离(x_A, x_B)以及沿着区域的垂直轴的垂直距离(y_A, y_B)。为了阐明图10的程序,图11提供了区域A和B以及它们各自最大值的实例图解。

[0114] 在1004,对于每个局部最大值1051和1052,确定从最大值至目标边缘的距离。在一些情况下,所确定的距离为在1002分配的区域平均或者中值距离,下文称为距离图。区域A的距离图下文中称为 r_A ,区域B的距离图称为 r_B 。

[0115] 在1006,基于两个局部最大值之间的距离“d”以及在1004确定的距离,计算包含因子。在一个实施方式中,包含因子利用下面的等式计算:

$$[0116] \quad (4) \text{ 包含因子} = \frac{d - r_A + r_B}{2r_B}$$

[0117] 在1008,确定包含因子是小于预定范围、大于预定范围还是在预定范围内(例如,在0.5和1之间)。如果包含因子小于预定范围,则确定最大值与同一目标相关联。如果其大于预定范围,则确定最大值与不同的目标相关联。

[0118] 对于落入范围内的包含因子,不能立即清楚最大值属于相同的目标还是不同的目标,并且需要更多的处理。程序1000然后在1010继续,其中使用在两个最大值之间的位置处

的第三区域“C”的坐标来计算两个最大值的各自周围区域的凸性。在一些情况下,该区域可以是两个区域的加权中心,使得区域C的中心点更接近较小的区域B而不是较大的区域A。对于区域C,也可以计算水平和垂直距离 x_C 、 y_C ,以及距离图H。例如,可使用上述的值以及区域C和最大值A的中心点之间的距离 $d(A,C)$,根据如下等式计算凸性:

$$[0119] \quad (5) \quad x_C = \frac{x_A + (x_B - x_A) * \text{偏移距离}}{d}$$

$$[0120] \quad (6) \quad y_C = \frac{y_A + (y_B - y_A) * \text{偏移距离}}{d}$$

$$[0121] \quad (7) \quad R = r_A + (r_B - r_A) * \frac{d(A,C)}{d}$$

$$[0122] \quad (8) \quad \Delta H = H - (0.9R)$$

[0123] 在1012,确定凸性值是否大于(更加凸起)给定的阈值。例如,可将 ΔH 与0的阈值比较。如果凸性值大于阈值,则该最大值被确定为与不同的目标相关联。否则,在1014,区域C的一个或者多个参数被更新,从而区域C的大小增加。例如,基于 ΔH 更新偏移距离(distOffset),例如, ΔH 的值被限定在0和1之间(如果 ΔH 大于1,其被四舍五入至1)并且然后被加至偏移距离。

[0124] 在1016,确定区域C的大小是否满足或者超过阈值。如果该阈值被满足或者超过,则该最大值被确定为与同一目标相关联。换句话说,如果区域A和B之间的差异是如此不确定的,使得区域C增加,直到其开始遮盖区域A和B,这是最大值1051和1052应当属于同一目标的良好指示。在上述的实例中,这可通过偏移距离满足或者超过最大值之间的距离 d 来指示。否则,操作返回至1010,并且基于区域C的更新的参数(一个或多个)重新计算区域A和B的凸性。

[0125] 一旦每个最大值的关联性被确定,确定的关联性被储存在例如矩阵(也被称作关联矩阵)中。储存的信息可用于将最大值的全部列表减少为候选目标的最终列表。例如,在关联矩阵的情况下,可从最大值的完全列表产生主列表(master list),并且然后可迭代地检查每个最大值,并且如果关联的最大值仍然在列表上,则从主列表中移除。

[0126] 在图9和10的实例中,第二图像拍摄的时间 t_x (并且,因此,程序900可被执行的最早时间)可以为进入孵育过程仅几个小时。这样的时间通过被认为太早而不能鉴定完全形成的菌落,但是可足以用于产生分割图像。分割图像可任选地运用至随后时间拍摄的未来图像。例如,菌落之间的边界可被绘制,以预测菌落的期望生长。然后,在菌落之间汇合的情况下,可利用边界分离汇合的菌落。

[0127] 利用时间 t_0 后两个或者更多个图像分析

[0128] 虽然上述过程和程序仅需要在时间 t_0 后拍摄一张图像(例如,在时间 t_0 的第一数字图像和在时间 t_x 的第二数字图像),其它的过程则需要在时间 t_0 以后拍摄至少第二图像。例如,如果发现在时间 t_x 的图像包括汇合的菌落,则可能要使用在时间 t_n (其中 $0 < n < x$)拍摄的另一图像来鉴定和分裂单个的菌落。

[0129] 例如,如果 t_0 =进入孵育0小时(此时没有生长发生),并且 t_x =进入孵育24小时(此时如此多的生长已经发生,以至于菌落现在汇合),在时间 t_n =12小时的图像(此时菌落会开始生长但是尚未汇合)将揭示单个菌落的存在。菌落生长然后基于时间 t_n 的图像被预测

(project),以评估在时间 t_x 的汇合菌落之间的边界。在这方面,时间 t_n 的图像可帮助区分快速生长的菌落与缓慢生长的菌落。本领域技术人员应当认识到随着在时间 t_0 和时间 t_x 之间拍摄的图像数量增加,菌落的生长速率将被更准确地预测。

[0130] 在前述概念的一个应用中,在时间 t_n 拍摄的图像(或者更一般地,在时间 t_0 和 t_x 之间拍摄的图像)可被用于鉴定菌落种子,其为被怀疑为将随着时间生长的菌落的目标,并且将该种子与相应的掩模和标记关联。每个种子接收独特的标记并且该标记将连同其它特征(例如,基于从SHQI图像生成的图像的位置、形态和直方图:红色通道、绿色通道、蓝色通道、照度、色度、色调或者复合图像)以及性质(例如,隔离/非隔离的状态、用于预测依时间增殖的其它信息)一起储存。为了提取平板全局指标,一些储存的特征(例如,直方图)也可以以平板级别(plate level)计算,而不是被归因于特定的种子。种子储存的特征可然后用来在时间 t_x 进行菌落提取,以及被作为输入提供给分类器,用于训练和/或测试。

[0131] 使用在 t_0 以后拍摄的多个图像的生长速率追踪也可以用于检测灰尘、伪像或者在工作流程程序的中间在平板上或成像镜头中出现的其它外来物体。例如,如果灰尘颗粒在 t_0 之后但是在 t_n 之前降落到在成像镜头上,则由该颗粒产生的斑点最初可能被解释为生长菌落,因为在时间 t_0 其不可见。然而,随后的成像揭示出该斑点的大小没有变化,则可确定该斑点不正在生长,并且因此不是菌落。

[0132] 除了生长速率和分割以外,菌落的其它方面可在 t_0 和 t_x 之间的额外图像的帮助下被追踪。在菌落中随着时间缓慢发展的细微形态变化的情况下,那些细微的变化可通过捕获更多的图像而更快地鉴定。在一些情况下,除了或者代替沿着通常的x和y轴测量生长,还可沿着z轴测量生长。例如,已知当在血琼脂中生长时肺炎链球菌会缓慢形成凹陷的中心,但是该凹陷的中心通常直到分析的第二天才可见。通过查看细菌生长的时间进程,初期下沉的中心可被检测到,与如果技术人员必须等待中心完全下沉相比,可更早得多地鉴定细菌。

[0133] 在另外的情况下,可知菌落会随着时间变化颜色。因此,在 t_0 之后的时间对具有第一颜色(例如,红色)的菌落成像,并且然后在随后的时间对具有第二颜色(例如,绿色)的菌落成像,可用于确定在菌落中生长的细菌的同一性。颜色变化可测量为通过颜色空间(例如,RGB、CMYK等)的矢量或者路径。菌落的其它色度特征的变化也可以类似地测量。

[0134] 目标特征

[0135] 如上结合图4所讨论的,在成像平板上的目标的特征可作为在成像平板上实施的图像分析的一部分进行表征。该表征的特征可包括静态特征(与单一图像有关)和动态图像(与多个图像有关)二者。

[0136] 静态特征目的在于反映在给定时间的目标属性和/或周围背景。静态特征包括如下内容:

[0137] (i) 重心:这是提供成像的目标在坐标空间(例如,x-y、极性)中的重心的静态特征。目标的重心,如目标的极坐标,提供在给定的光照和背景条件下特征组的不变性。重心可通过首先为图像中所有的菌落确定加权的质心来获得(M是所有检测的菌落的二元掩模)。加权的质心可基于图像的每个像素具有相等值的假定确定。给定菌落的重心然后可在x-y坐标系中通过如下的等式描述(其中 $E = \{p | p \in M\}$ (E是当前菌落的二元掩模),x坐标的范围为[0,图像宽度],y坐标的范围为[0,图像高度],并且每个像素是一个单位):

[0138] (9) $igv_{(x,y)} \left(x = \frac{1}{\sum_{p \in E} 1} \times \sum_{p \in E} p_x, y = \frac{1}{\sum_{p \in E} 1} \times \sum_{p \in E} p_y \right)$

[0139] (ii) 极坐标:这也是静态特征,并且可用于进一步表征在成像平板上的位置,如重心。通常来说,极坐标沿着径向轴(d)和角轴(θ)来测量,其中平板中心的坐标为[0,0]。 $igv_{(x,y)}$ 的坐标d和 θ 通过如下等式给出(d的单位为毫米, θ 的单位为度)(其中k是对应像素至毫米的像素密度,并且“条形码”是成像平板的标志特征,用于确保平板与之前的和/或未来的图像对齐):

[0140] (10) $d = k \times \text{距离}(igv_{(x,y)}, 0_{(x,y)})$

[0141] (11) $\theta = \text{角度}(\text{条形码}, 0_{(x,y)}, igv_{(x,y)})$

[0142] (iii) 图像矢量:二维极坐标可又变换为一维的图像矢量。该图像矢量可表征图像的像素的强度作为径向轴(通常,菌落的中心具有最高的强度)的函数和/或角轴的函数。在许多情况下,图像矢量在成像目标中分类相似性/区别方面可更加精确。

[0143] (iv) 形态特征:其描述给定目标的形状和大小。

[0144] (a) 面积:这是一个形态特征,并且可基于成像目标中的像素的数量来确定(也被称作“点(blob)”),不计算目标中的孔。当像素密度可用时,可以以物理尺寸测量面积(例如, mm^2)。相反,当像素密度不可用时,像素的总数可以指示大小,并且像素密度(k)可设定为等于1。在一个实施方式中,使用下列等式计算面积:

[0145] (12) $A = k^2 \times \sum_{p \in E} 1$

[0146] (b) 周长:目标的周长也是形态特征,并且可通过测量目标的边缘并且把边缘的总长度加和在一起来确定(例如,具有1平方单位面积的单个像素具有4单位的周长)。与面积一样,长度可用像素单位(例如当k不可用时)或者物理长度(例如,当k可用时)来测量。在一些情况下,周长还可包括目标中任何孔的周长。另外地,阶梯效应(当对角线的边缘被数字化为阶梯状的箱(box)所导致)可通过计数内角为 $\sqrt{2}$ 而不是2来补偿。在一个实施方式中,使用下列等式确定周长:

[0147] (13) $P = k \times \sum_{p \in E} q(n_p)$

[0148] (14) $n_p = \begin{Bmatrix} t \\ l \quad p \quad r \\ b \end{Bmatrix}$

[0149] 如果:

[0150] $\{\sum(t \in M, l \in M, r \in M, b \in M) = 2, (l \in M \neq r \in M), (t \in M \neq b \in M)\}$

[0151] (p是内部的并且p是角)

[0152] 那么: $q(n_p) = \sqrt{2}$

[0153] 否则: $q(n_p) = 4 - \sum(t \in M, l \in M, r \in M, b \in M)$

[0154] (c) 圆度:目标的圆度也是形态特征,并且可根据面积和周长的结合来确定。在一个实施方式中,使用下列等式计算圆度:

[0155] (16) $C = \frac{4\pi A}{P^2}$

[0156] (d) 半径变异系数(RCV):这也是形态特征,并且用于通过取得目标在自重心延伸

的所有N个方向或者角度 θ 中的平均半径 $\bar{R}$ 与半径的标准差 σ_R 之间的比率来指示目标半径的变化。在一个实施方式中,该值可使用下列等式计算:

$$[0157] \quad (17) \quad \bar{R} = \frac{\sum_{\theta=0}^{2\pi} R_{\theta}}{N_{\theta}}$$

$$[0158] \quad (18) \quad \sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{\theta=0}^{2\pi} (R_{\theta} - \bar{R})^2}{N_{\theta} - 1}}$$

$$[0159] \quad (19) \quad RCV = \frac{\sigma_R}{\bar{R}}$$

[0160] (v) 处境特征(contextual feature),其描述在对其它检测的目标和板壁边缘的监视下,目标的邻域地形关系。例如,在成像的菌落的情况下,菌落的一个处境特征可以是,菌落是自由的、具有有限的自由空间、还是与其它周围的菌落竞争使用(access to)资源。这样的特征趋向于帮助分类在相同的感知环境中生长的菌落,并且/或者区分在不同环境中生长的菌落。

[0161] (a) 影响区域:这是考虑目标与其周围目标之间的空间并且预测分析的目标可扩展占据的区域(没有其它的、不同的目标首先扩展占据该相同区域)的处境特征。影响区域可以以Voronoi图的形式表示,如图12中所示的图,其中示出了基于菌落1201与其周围菌落例如1205之间的距离d的影响区域(阴影部分)。在一个实施方式中,从目标的边缘至影响区域的边缘之间的距离(D_{NC})可使用下列等式表征:

$$[0162] \quad (20) \quad D_{NC} = k \times \text{Min}[\text{距离}(p \in E, p \notin M \leftarrow E)]$$

[0163] (b) 至板壁的距离:这是计算目标的边缘距最近的板壁的距离(D_{PW})的处境特征。在一个实施方式中,该距离可使用下列等式表征:

$$[0164] \quad (21) \quad D_{PW} = k \times \text{Min}[\text{距离}(p \in E, p \notin \text{平板})]$$

[0165] (c) 隔离因子:这是基于目标的大小和距最近边缘(例如,另一个目标、板壁的最近边缘)的距离来表征给定目标的相对隔离的处境特征。图13A-C图解了隔离因子的方面。图13A图解了其中最近边缘是从菌落到板壁的距离d的示例。图13B和13C图解了其中最近边缘属于另一菌落的示例。在这样的情况下,绘制以分析的菌落为中心围绕其的圆,然后扩张(首先小的,如图13B,然后更大的,如图13C)直到圆接触相邻菌落。在图13A-C的实施方式中,隔离因子可使用下列等式表征:

$$[0166] \quad (22) \quad IF = \frac{\text{Min}(D_{NC}, D_{PW})}{R}$$

[0167] (d) 周边占据比率:这是表征对于给定目标在给定的距离d内,影响的平板的边界Voronoi区域(V)的面积部分的处境特征。在一个实施方式中,周边占据比率(OR)可使用下列等式表征(其中对于该等式, $E = \{p | p \in V, \text{dist}(p, \text{igv}_{(x,y)}) < d\}$):

$$[0168] \quad (23) \quad OR(d) = \frac{k^2 \times \sum_{p \in E} 1}{\pi(d/2)^2}$$

[0169] (e) 相对周边占据比率: 在一些示例中, 可使用目标的平均半径乘以预定因子 ($d = x \times \bar{R}$) 来得到给定的距离 d 。该结果是相对周边占有比率 (RNOR), 并且针对给定因子 x 可使用下列等式推导:

[0170] (24) $RNOR(x) = NOR(d)$

[0171] (vi) 光谱特征, 其描述给定目标的光性质。颜色 (红色、绿色和蓝色通道; 色调、照度和色度, 或者任何其它颜色空间变换)、纹理和对比度 (随着时间和/或跨越空间) 是这样特征的实例。光谱特征可在使用菌落掩模的孵育过程期间从在不同的时间点和/或在不同的照明条件下捕获的图像推导出, 并且可进一步与给定菌落的影响的 Voronoï 区域相关联。

[0172] (a) 通道图像: 这是光谱特征, 其中特定的颜色通道 (例如, 红色 (R)、绿色 (G) 和蓝色 (B)) 用于光谱分辨图像。

[0173] (b) 亮度: 这也是光谱特征, 其用于使用 RGB 通道作为输入来表征图像的亮度。

[0174] (c) 色调: 这是光谱特征, 其中图像的面积被表征为表现与被感知的颜色 (例如, 红色、黄色、绿色、蓝色) 或者其结合类似。色调 (H2) 通常使用下列等式表征:

[0175] (25) $H_2 = \text{atan2}(\beta, \alpha)$

[0176] (26) $\alpha = R - \frac{1}{2}(G + B)$

[0177] (27) $\beta = \frac{\sqrt{3}}{2}(G - B)$

[0178] (d) 色度: 这是用于表征图像区域相对于其亮度的视彩度 (colorfulness) 的光谱特征——如果该区域被类似地照明为白色。色度 (C_2) 通常使用下列等式表征:

[0179] (28) $C_2 = \sqrt{\alpha^2 + \beta^2}$

[0180] (e) 径向分散: 分析色调和色度对比度的径向分散能够实现 α 、 β 和 γ 溶血的区分。

[0181] (f) 最大对比度: 该特征通过计算距图像的中心点 (例如, 成像的菌落的中心) 给定半径 r 处像素的测量平均对比度的最大值, 来表征图像的分辨率。该特征可用于基于由分析目标诱导的生长描述在时间 t_0 和 t_x 拍摄的图像之间可感知的差异。最大对比度可被表征如下:

[0182] (29) 最大对比度_r = MAX (平均对比度_r)_{目标}

[0183] (vii) 背景特征, 其描述分析目标的邻域中的培养基的改变。例如, 在成像菌落的情况下, 该变化可以由菌落周围微生物的生长引起 (例如, 溶血迹象、PH 的改变或者特定的酶促反应)。

[0184] 动态特征目的在于反映目标属性和/或周围环境随着时间的变化。时间序列处理允许静态特征随时间相关。这些特征的离散的一阶和二阶导数提供这些待表征特征随时间变化的瞬时“速度”和“加速度” (或者稳定水平或减速度)。动态特征的实例包括如下内容:

[0185] (i) 用于追踪上述静态特征随时间变化的时间序列处理。在给定孵育时间测量的每个特征可根据其相对孵育时间被参考, 以允许这些特征与在随后孵育时间测量的特征相关联。图像的时间序列可用于检测目标例如 CFU 随着时间出现和生长, 如上文所述。基于对之前捕获的目标图像的正在进行的分析, 可通过自动的过程对成像的时间点进行预设或者限定。在每个时间点, 图像可以是给定获取配置, 无论是整个系列的单个获取配置, 或者

作为从多个获取配置捕获的整个系列的图像。

[0186] (ii) 用于提供这些特征随着时间变化的瞬时速度和加速度(或者稳定水平或减速度的)上述特征的离散的一阶和二阶导数(例如,追踪生长速率,如上文所述):

[0187] (a) 速度:特征对时间的一阶导数。基于下列等式,特征x的速度(V)可以以(x单位)/小时表征, Δt 是以小时表示的时间跨度:

$$[0188] \quad (30) \quad V = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left(\frac{dx}{dt} \right)^n$$

$$[0189] \quad (31) \quad V_{1,0} = \frac{x_1 - x_0}{t_1 - t_0}$$

$$[0190] \quad (32) \quad V_{2,1} = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1}$$

[0191] (b) 加速度:特征对时间的二阶导数,也是速度的一阶导数。加速度(A)可基于下列等式表征:

$$[0192] \quad (33) \quad A = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{dV}{dt}$$

[0193] 上述图像特征可从目标或者目标的处境测量,并且目的在于捕获在各种培养基和孵育条件下生长的生物体的特异性。列出的特征不意味着是穷举的,并且本领域技术人员可以根据本领域已知的多种基于已知图像处理的特征来改进、扩大或者限制该特征组。

[0194] 图像特征可针对图像中每个像素、像素的组、目标或者目标的组收集。为了更一般地表征图像的区域甚至整个图像,收集特征的分布可以以直方图构造。为了分析或者以其它方式处理到来的图像特征数据,直方图本身可依赖于数种统计特征。

[0195] 统计直方图特征可以包括如下内容:

[0196] (i) 最小值:直方图内捕获的分布的最小的数值。这可通过下面的关系表征:

$$[0197] \quad (34) \quad Min = i \left\{ \left[h(i) > 0, \sum_{j=0}^{i-1} h(j) = 0 \right] \right\}$$

[0198] (ii) 最大值:直方图内捕获的分布的最大的数值。这可根据下面的关系表征:

$$[0199] \quad (35) \quad Max = i \left\{ \left[h(i) > 0, \sum_{j=i+1}^{\infty} h(j) = 0 \right] \right\}$$

[0200] (iii) 总和:直方图内捕获的所有单个值的总和。总和可通过下面的关系限定:

$$[0201] \quad (36) \quad \text{总和} = \sum_{i=\min}^{\max} i \times h(i)$$

[0202] (iv) 平均值:算术平均,或者平均。根据下列关系,这是所有分数的总和除以分数的数量(N):

$$[0203] \quad (37) \quad \text{平均值} = \frac{\sum_{i=\min}^{\max} i \times h(i)}{N}$$

[0204] (v) 四分之一(Q1):分布的百分之25的分数。25%的分数低于Q1,并且75%的分数高于Q1。这可通过下面的关系描述:

$$[0205] \quad (38) \quad Q_1 = i \left\{ \left[\sum_{j=\min}^{i-1} h(j) < \frac{N}{4}, \sum_{j=i}^{\infty} h(j) \geq \frac{N}{4} \right] \right\}$$

[0206] (vi) 中位数(Q2):分布的百分之50的分数。50%的分数低于中位数,并且50%的分

数高于中位数。与平均值相比,中位数对极端分数较不敏感,并且这通常使其对于高度斜分布来说,是比平均值更好的量度。这可通过下面的关系描述:

$$[0207] \quad (39) \text{ 中位数} = Q_2 = i \left| \left\{ \sum_{j=\min}^{j \leq i} h(i) < \frac{N}{2}, \sum_{j=\min}^{j \leq i} h(i) \geq \frac{N}{2} \right\} \right.$$

[0208] (vii) 四分之三 (Q3): 分布的百分之75的分数。75%的分数低于Q3并且25%的分数高于Q3。这通过下面的关系描述:

$$[0209] \quad (40) Q_3 = i \left| \left\{ \sum_{j=\min}^{j \leq i} h(i) < \frac{3}{4}N, \sum_{j=\min}^{j \leq i} h(i) \geq \frac{3}{4}N \right\} \right.$$

[0210] (viii) 模式: 在分布中最经常出现的分数。这用作集中趋势的量度。模式作为集中趋势的量度的优点在于: 它的含义是显而易见的。而且, 它是可以与标称数据一起使用的集中趋势的仅有量度。模式在很大程度上受制于样品波动并且因此通常不用作集中趋势的唯一量度。同样, 很多分布具有多于一个的模式。这些分布被叫做“多峰的”。模式可通过下面的关系描述:

$$[0211] \quad (41) \text{ 模式} = i \left\{ h(i) \geq h(i)_{i=\min}^{\max} \right\}$$

[0212] (ix) 三均值 (trimean): 将第25个百分点加上两倍的第50个百分点 (中位数) 加上第75个百分点, 并且除以4计算的分数。三均值几乎与中位数一样抗拒极端分数, 并且在斜分布中, 与算术平均值相比, 较少受制于采样波动。然而, 针对正态分布, 其通常不如平均值有效。三均值可根据下面的关系描述:

$$[0213] \quad (42) \text{ 三均值} = \frac{Q_1 + 2Q_2 + Q_3}{4}$$

[0214] (x) 截断平均值: 通过丢弃一定百分比的最低和最高分数, 然后计算剩余分数的平均值, 从而计算的分数。例如, 截断50%的平均值是通过丢弃较低和较高的25%的分数, 并且计算剩余分数的平均值, 从而计算的。进一步的实例, 中位数是截断100%的平均值, 算术平均值是截断0%的平均值。与算术平均值相比, 截断平均值通常不易受到极端分数的影响。因此对于斜分布来说, 与平均值相比, 其不易受到采样波动的影响。对正态分布来说, 它通常效率较低。作为一个实例, 截断50%的平均值由下列关系描述:

$$[0215] \quad (43) \text{ 截断平均值}_{50} = \frac{\sum_{i=Q_1}^{Q_3} i \times h(i)}{\sum_{i=Q_1}^{Q_3} h(i)}$$

[0216] (xi) 范围: 最小的和最大的数值之间的差。范围可以是可用的扩展的量度。然而, 由于其仅基于两个值, 其对极端分数敏感。由于这种敏感性, 范围通常不用作扩展的唯一量度, 但是如果用作对扩展的其它量度如标准差或者半内四分距的补充, 其还是有意义的。

[0217] (xii) 半内四分距: 计算为75百分位 (Q3) 和25百分位 (Q1) 之间的差的一半的扩展的量度。由于分布中一半的分数位于Q3和Q1之间, 半内四分距是覆盖所述一半分数所需的距离的一半。在对称分布中, 从低于中位数的一个半内四分距伸展至高于中位数的一个半内四分距之间的间距将包含一半的分数。然而, 对斜分布来说不是这样的。与范围不同, 半内四分距通常基本上不受极端分数的影响。然而, 在正态分布中其比标准差更容易受到采样波动的影响, 并且因此不经常用于近似正态分布的数据。半内四分距根据如下的关系来限定:

[0218] (44) 半内四分距 $= \frac{Q_3 - Q_1}{2}$

[0219] (xiii) 方差:分布扩展的量度。根据如下的关系,通过从其平均值取得每个数的均方差,计算方差:

[0220] (45) 方差 $= \frac{1}{n-1} \sum_{i=\min}^{\max} h(i) \times (i - \text{平均值})^2$

[0221] (xiv) 标准差:方差的函数,其测量分布的值与平均值多宽地离散。标准差是方差的平方根。虽然与范围相比,其通常对极端分数较不敏感,但标准差通常比半内四分距更敏感。因此,当有极端分数存在的可能时,半内四分距可用于补充标准差。

[0222] (xv) 偏度:围绕其平均值的分布不对称性的度量。如果分布的尾部之一比另一个更长,则分布是偏斜的。正偏度表明具有朝着更正的值(大于平均值)延伸的不对称尾部的分布。负偏度表明具有朝着更负的值(小于平均值)延伸的不对称尾部的分布。偏度可根据下列关系计算:

[0223] (46) 偏度 $= \frac{N}{(N-1) \times (N-2)} \sum_{i=\min}^{\max} (h(i) \times (\frac{i - \text{平均值}}{\text{标准差}})^3)$

[0224] (xvi) 峰度:与正态分布相比,分布的陡度或者平坦度的量度(或者相对峰宽)。正的峰度表示相对尖的分布。负的峰度表示相对平的分布。峰度基于分布的尾

[0225] 部的大小,并且可通过下列关系确定:

[0226] (47) 峰度 $= \frac{N \times (N+1)}{(N-1) \times (N-2) \times (N-3)} \sum_{i=\min}^{\max} (h(i) \times (\frac{i - \text{平均值}}{\text{标准差}})^4) - 3 \frac{(N-1)^2}{(N-2) \times (N-3)}$

[0227] 上述统计方法可用于分析灰度值的空间分布,这通过计算图像中每个点处的局部特征和从局部特征的分布得到一组统计结果进行。利用这些统计方法,分析区域的纹理可被描述并且被静态地限定。

[0228] 纹理可使用纹理描述符来表征。纹理描述符可在图像的给定区域上计算(在下文更详细地讨论)。一种通常运用的纹理方法是共现(co-occurrence)方法,由Haralick,R.等人提出,“用于图像分类的纹理特征”,IEEE Transactions of System,Man and Cybernetics,Vol.3,pp.610-621(1973),其通过引用并入本文。在该方法中,在 θ 方向上分开距离d的像素的灰度级对的相对频率被结合以形成相对位移矢量(d, θ)。相对位移矢量被计算并且储存在矩阵中,称作灰度级共现矩阵(GLCM)。该矩阵用于提取二阶统计的纹理特征。Haralick提出14种不同的特征来描述二维概率密度函数 p_{ij} ,所述特征中的四种比其它的更常用:

[0229] 纹理可使用纹理描述符来表征。纹理描述符可在图像的给定区域上计算(在下文更详细地讨论)。一种通常运用的纹理方法是共现(co-occurrence)方法,由Haralick,R.等人提出,“用于图像分类的纹理特征”,IEEE Transactions of System,Man and Cybernetics,Vol.3,pp.610-621(1973),其通过引用并入本文。在该方法中,在 θ 方向上分开距离d的像素的灰度级对的相对频率被结合以形成相对位移矢量(d, θ)。相对位移矢量被计算并且储存在矩阵中,称作灰度级共现矩阵(GLCM)。该矩阵用于提取二阶统计的纹理特征。Haralick提出14种不同的特征来描述二维概率密度函数 p_{ij} ,所述特征中的四种比其它的更常用:

[0230] (i) 角二阶矩 (ASM) 通过下式计算:

$$[0231] \quad (48) \quad ASM = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} p_{ij}^2$$

[0232] (ii) 对比度 (Con) 通过下式计算:

$$[0233] \quad (49) \quad Con = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} (i-j)^2 p_{ij}$$

[0234] (iii) 相关性 (Cor) 通过下式计算 (其中 σ_x 和 σ_y 是相应的分布的标准差):

$$[0235] \quad (50) \quad Cor = \frac{1}{\sigma_x \sigma_y} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} p_{ij} \log(p_{ij})$$

[0236] (iv) 熵 (Ent) 通过下式计算:

$$[0237] \quad (51) \quad Ent = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} p_{ij} \log(p_{ij})$$

[0238] 这四个特征还列出在 Strand, J. 等, “用于纹理分类的局部频率特征”, Pattern Recognition, Vol. 27, No. 10, pp 1397-1406 (1994) [Strand94] 中, 其也通过引用并入本文。

[0239] 对于给定的图像, 上述特征被评估的图像区域可通过掩模 (例如, 菌落掩模) 或者通过延伸超出掩模的影响的 Voronoi 区域限定。

[0240] 图14示出了几种可能的区域。区域1410是仅扩展远至菌落本身的菌落掩模。区域1420是菌落的影响的 Voronoi 区域 (由图像或者平板的边缘限定的)。为进一步的说明, 像素1430是区域1420内但是在区域1410之外的像素。换句话说, 由区域1410代表的菌落预期扩展入像素1630, 但是目前还没有。像素1440是区域1410和1420二者之外的像素。换句话说, 该菌落不但在成像的时间没有占据像素1410, 而且预期在将来的任何时间也不会被该菌落占据 (在这种情况下, 其已经被不同的菌落占据)。

[0241] 如上文所述, 使用沿着孵育过程中的不同时间点的菌落掩模以及它们相关的影响的 Voronoi 区域, 能够生成多个描绘菌落不同方面以及它们对局部周围生长培养基的影响的直方图。菌落掩模和影响 Voronoi 区域本身可随时间调整, 例如随着菌落生长调整。例如, 图15A-C图解了菌落的生长可如何用于随着时间调节菌落的掩模。图15A是在琼脂中生长24小时后的血培养物的一部分。图15B是与之前在 t_0 捕获的图像相比, 相同的培养物的对比度图像。图15C是图解在9小时 (最浅)、12小时 (中等) 和24小时 (最暗) 生长的灰度图像。图15C中的每个阴影可用于为菌落设计不同的掩模。可选择地或者另外地, 随着生长发生, 可根据其各自的影响的 Voronoi 区域分开掩模。

[0242] 上述特征列表中的任何一个特征或者特征的结合可用作特征组, 用于在不同的孵育条件下, 捕获在成像平板的各种培养基上生长的生物体的特异性。该列表并不意味着是详尽的, 并且本领域任何技术人员可以根据待成像的预期目标和本领域已知的多种基于基于图像处理的特征来改进、扩大或者限制这些特征组。因此, 上述实例特征是以例证的方式提供的, 而不是限制性的。

[0243] 本领域技术人员可意识到其它的测量和方法来确定目标形状和特征, 并且上述的实例是以例证的方式提供的, 而不是限制性的。

[0244] 对比度建立

[0245] 通常难以最初预测图像序列中哪一个图像将对生长检测、计数或鉴定提供价值。这部分是因为对于不同的菌落形成单位 (CFU) 以及在不同的培养基中, 图像对比度变化。在

数个菌落的给定图像中,一个菌落可能与背景具有高度希望的对比度,而另一个菌落可能与背景不具有用于生长检测的足够对比度。这也使得使用单一方法鉴定培养基中的菌落变得困难。

[0246] 因此,期望从所有可用的材料,通过空间(空间差异)和时间(在相同成像条件下的时间差异),以及通过使用不同的成像条件(例如,红色、绿色和蓝色通道,亮的和暗的背景,光谱图像或者任何其它的颜色空间变换),建立对比度。还期望从多个可用的来源收集对比度,来提供标准化的图像作为算法的输入,用于检测菌落。

[0247] 图像数据可基于任何数量的因素来限定。例如,图像数据可被限定为寻求的具体时间点和/或具体信息(例如,空间图像信息可能不需要像时间图像信息所需的那么多时间点)。也可以选择照明配置和颜色空间,以实现特定的对比度目标。为了检测具有所需尺寸(或者在目标范围内的尺寸)的目标,空间频率也可以改变。

[0248] 为了检测离散的目标,对比度可被设定为 $[0, 1]$ 上的绝对值,或者带正负符号的 $[-1, 1]$ 。对比度输出的标度(scale)和偏移也可以被指定(例如,具有带正负符号的对比度的8比特的图像,偏移可以为127.5,标度可以是127.5)。在其中对比度被设定为极值的实例中,绝对偏移可设定为0,标度设定为256。

[0249] 空间对比度可用于检测在均匀背景上的离散的目标。可利用等式提供图像I上距离r内的位置 (x, y) 处的空间对比度 $C_{(x,y)}^{I,r}$ 的自动化评估。在一个实施方式中,其中距离r被限定为大于或者等于 $\sqrt{(x_i - x)^2 + (y_i - y)^2}$ 的距离,并且对比度算符K被用于控制对比度设定,运用如下的等式:

$$[0250] \quad (52) \quad C_{(x,y)}^{I,r} = \frac{|I_{(x,y)} - K_{(x_i,y_i,r)}|}{I_{(x,y)} + K_{(x_i,y_i,r)}}$$

$$[0251] \quad (53) \quad K_{(x_i,y_i,r)} = \frac{1}{\pi \cdot r^2} \sum_r I_{(x_i,y_i)}$$

[0252] 时间对比度可用于检测移动的目标或者随着时间变化的目标(例如在成像平板上出现和/或扩展的CFU)。可利用等式提供在图像I上时间 t_0 和 t_x 之间、位置 (x, y) 处的时间对比度 $C_{(x,y)}^{I(t_x,t_0)}$ 的自动化评估。在一个实施方式中,运用如下的等式:

$$[0253] \quad (54) \quad C_{(x,y)}^{I(t_x,t_0)} = \frac{|I_{(x,y)}^{t_x} - I_{(x,y)}^{t_0}|}{I_{(x,y)}^{t_x} + I_{(x,y)}^{t_0}}$$

[0254] 空间对比度收集可以根据预先编程的顺序以自动化的方式通过生成平板的多个SHQI图像进行实施。可以在给定的孵育时间生成多个图像,以进一步菌落检测研究。在一个实施方式中,其中根据如下的等式,在给定的时间、在距检测的菌落的数个不同半径处($R_{\min}$ 至 $R_{\max}$),对数个配置(从 CFG_1 至 CFG_N)收集图像数据(特别是,用于为对比度收集操作者提供对比度输入的矢量“vect”):

$$[0255] \quad (55) \quad C_{(x,y)}^{(R_{\min}, R_{\max})} = \text{vect}\{CFG_1, \dots, CFG_N\}_{(R_{\min}, R_{\max})} \text{Max}\left(\frac{|I_{(x,y)} - K_{(x_i,y_i,r)}|}{I_{(x,y)} + K_{(x_i,y_i,r)}}\right)$$

[0256] 如果对于给定的图像 $I_{(x,y)}$, SNR是已知的(例如,当SHQI成像是来源时),则当满足下式时,其中SNR加权的对比度被最大化的配置可被鉴定为最佳配置(Best CFG):

$$[0257] \quad (56) \quad \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{CFG} \left(\frac{|I_{(x,y)} - K_{(x_i, y_i, r)}|}{I_{(x,y)} + K_{(x_i, y_i, r)}} \right) * SNR_{(x,y)} \text{ 是最大值, 超过:}$$

$$[0258] \quad (57) \quad \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{vect\{CFG_1, \dots, CFG_N\}} \left(\frac{|I_{(x,y)} - K_{(x_i, y_i, r)}|}{I_{(x,y)} + K_{(x_i, y_i, r)}} \right) * SNR_{(x,y)}$$

[0259] 对比度算符K进一步得益于该已知的SNR信息,并且上述等式变为:

$$[0260] \quad (58) \quad C_{(x,y)}^{(R_{\min}, R_{\max})} = \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{vect\{CFG_1, \dots, CFG_N\}^{Best \text{ CFG}}} \left(\frac{|I_{(x,y)} - K_{(x_i, y_i, r)}|}{I_{(x,y)} + K_{(x_i, y_i, r)}} \right)$$

[0261] 时间对比度收集也可以根据预先编程的顺序,以自动化的方式,通过生成平板的多个SHQI图像进行实施。多个图像可在多个孵育时间内生成,至少其中的一个是 t_0 ,以进一步的菌落检测研究。在一个实施方式中,根据如下的等式,在时间 t_0 以及一个或者多个随后的上至 t_x 的孵育时间,对数个配置收集图像数据:[对于之前将“N”用于矢量和配置二者的等式,下面是修改的可接受的等式,或者可以将 T_N 用回等式中]

$$[0262] \quad (59) \quad C_{(x,y)}^{vect\{t_0, \dots, t_x\}} = vect\{CFG_1, \dots, CFG_N\} Max \left(\frac{\frac{N}{I_{(x,y)}^{t_x}} - I_{(x,y)}^{t_0}}{I_{(x,y)}^{t_x} + I_{(x,y)}^{t_0}} \right)$$

[0263] 在上述的实例中,矢量可以是两个时间点(例如, t_0 和 t_x)之间的矢量,这基于在那两个时间的图像中的差异。然而,在其它应用中,其中包括在 t_0 和 t_x 之间的额外时间,可以如拍摄图像的时间一样多的点绘制矢量。数学上说,对矢量中可包括的数量点没有限制。

[0264] 与空间对比度一样,如果对于给定的图像 $I_{(x,y)}$, SNR是已知的,则当满足下式时,其中SNR加权的对比度被最大化的配置可被鉴定为最佳配置(Best CFG):

$$[0265] \quad (60) \quad \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{CFG} \left(\frac{\frac{N}{I_{(x,y)}^{t_x}} - I_{(x,y)}^{t_0}}{I_{(x,y)}^{t_x} + I_{(x,y)}^{t_0}} \right) * SNR_{(x,y)} \text{ 是最大值, 超过:}$$

$$[0266] \quad (61) \quad \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{vect\{CFG_1, \dots, CFG_N\}} \left(\frac{\frac{N}{I_{(x,y)}^{t_x}} - I_{(x,y)}^{t_0}}{I_{(x,y)}^{t_x} + I_{(x,y)}^{t_0}} \right) * SNR_{(x,y)}$$

[0267] 对比度算符K进一步得益于该已知的SNR信息,并且上述等式变为:

$$[0268] \quad (62) \quad C_{(x,y)}^{vect\{t_0, \dots, t_x\}} = \underset{(R_{\min}, R_{\max})}{vect\{CFG_1, \dots, CFG_N\}^{Best \text{ CFG}}} \left(\frac{\frac{N}{I_{(x,y)}^{t_x}} - I_{(x,y)}^{t_0}}{I_{(x,y)}^{t_x} + I_{(x,y)}^{t_0}} \right)$$

[0269] 在上述的实例中,最大算符可由任何其它统计算符代替,例如百分位(例如,Q1、中

位数、Q3或者任何其它百分位)或者加权的总和。加权的数值可来自从训练数据库提取的前期工作,由此将监督对比度提取的领域打开至神经网络。另外地,可以使用多种算法,多种算法的结果使用另一个算符例如最大算符进一步结合。

[0270] 图像对齐

[0271] 当随着时间拍摄多个图像时,为了从它们获得有效的的时间估计,需要非常精确地对齐图像。这样的对齐可通过机械对齐装置和/或算法(例如,图像追踪、图像匹配)的方式来实现。该领域的那些知识对实现该目标的这些方案和算法是已经认知的。

[0272] 例如,在收集了平板上的目标的多个图像的情况中,可确定目标位置的坐标。基于这些坐标,在随后时间收集的目标的图像数据可然后与之前的图像数据相关联,并且随后用于确定目标随着时间的变化。

[0273] 为了快速以及有价值地利用图像(例如,当用作分类器的输入时),在空间参照系储存图像以最大化其不变性是重要的。因为菌落的基本形状描述符是大体上圆形的,所以极坐标系可用来储存菌落图像。当菌落第一次被检测到时,菌落质心可被鉴定为菌落位置的中心。该中心点以后可作为菌落的每个后续图像的极坐标变换的初始中心。图16A示出了具有中心点“0”的成像平板的放大部分。从点“0”延伸的两条射线“A”和“B”被示出覆盖在图像上(为了清楚的目的)。每条射线与各自的菌落(被圈住的)相交。图16A的圈住的菌落在图16B的图像1611和1612中更详细地显示。在图16B中,图像1611(与射线“A”相交的菌落)被重新定向在图像1613(“A'”)内,使得图像1613的径向轴与图像1612的径向轴对齐,从而该重新定向的图像的最左部分与图16A的点“0”最接近,并且该重新定向的图像的最右侧部分与点“0”离得最远。该极坐标的重新定向允许更容易地分析成像平板的不同取向的菌落(考虑到如照明这样的因素)。

[0274] 在图16C中,对图16B的图像1611、1612和1613的每个完成极坐标变换。在极坐标变换的图像1621、1622和1623中,各自重新定向的图像1611、1612和1613的径向轴(从每个各自成像的菌落的中心延伸)在图16C的图像中从左到右绘制,并且角轴(各自菌落的)从上向下绘制。

[0275] 对于每个极坐标图像,可使用例如形状特征和/或直方图特征(例如目标的颜色或者强度的平均值和/或标准差),沿着径向轴和/或角轴,生成汇总的一维矢量组。甚至当考虑旋转时形状和直方图特征通常是不变的,也有可能是在旋转时一些纹理特征显示显著的变化;因此,不能保证不变性。因此,从相同的视点或者角度照明来呈现每个菌落图像是显著有益的,这是因为目标纹理差异可随后被用于互相区分。由于照明条件通常示出与围绕平板成像中心的角度位置相关的变化,所以穿过菌落和平板中心的射线(在图16B的图像1611、1612和1613的每个中示出为线)可作为每次图像极坐标变换的原点(0)。

[0276] 进一步的对齐挑战来自于这样的事实:平板培养基不是绝对冷冻的和刚性的,并且因此可从一次拍摄至下一次拍摄轻微移位。因此,不能绝对假定在一个时间拍摄的图像的某些坐标处的平板区域必然完美地与在稍后时间拍摄的相同坐标处的平板区域对齐。换言之,关于孵育过程期间将给定像素与在不同时间点捕获的相应像素精确匹配,培养基的轻微变形可导致小的不确定性。

[0277] 为了考虑这种不确定性,时间 t_a 的给定像素的强度值 $I_{(x,y)}^a$ 可与不同时间点 t_b 的该

像素的局部邻域 $N(x, y)$ 内的最接近的强度值 $I_{N(x, y)}^{t_b}$ 相比较。对局部邻域的选择可包括确定从一个时间至下一个时间成像平板的重新定位中的一个或者多个误差或者不精确性(例如,由于成像的培养基的不完美的重新定位引起的位置精度误差,由于从一个时间至下一个时间的未知的成像培养基的高度引起的视差误差)。在一个实例中,已经观察到将“x”和“y”设置在大约3至大约7个像素的范围内适于具有大约每个像素50微米的分辨率的图像。

[0278] 本领域任何技术人员将认识到从 t_b 源图像生成两个 t_b 图像的有效方案:第一图像对应于 t_b 的灰度级膨胀(dilation)(称作 $DIL_{(x, y)}^{t_b, d}$)和第二图像对应于 t_b 的灰度级腐蚀(erosion)(称作 $ERO_{(x, y)}^{t_b, d}$),二者都具有匹配重新定位的距离不确定性d的内核尺寸。

[0279] 如果 $ERO_{(x, y)}^{t_b, d} \leq I_{(x, y)}^{t_a} \leq DIL_{(x, y)}^{t_b, d}$,则对比度为0,否则对比度使用如下等式从 $ERO_{(x, y)}^{t_b, d}$ 和 $DIL_{(x, y)}^{t_b, d}$ 中最接近 $I_{(x, y)}^{t_a}$ 的值估计:

$$[0280] \quad (63) \quad C_{(x, y)}^{(t_a, t_b)} = \left(\frac{|I_{(x, y)}^{t_a} - K_{(x, y)}^{t_b}|}{I_{(x, y)}^{t_a} + K_{(x, y)}^{t_b}} \right)$$

$$[0281] \quad (64) \quad K_{(x, y)}^{t_b} = ERO_{(x, y)}^{t_b, d} \text{ if } \left(|ERO_{(x, y)}^{t_b, d} - I_{(x, y)}^{t_a}| < |DIL_{(x, y)}^{t_b, d} - I_{(x, y)}^{t_a}| \right)$$

$$[0282] \quad (65) \quad K_{(x, y)}^{t_b} = DIL_{(x, y)}^{t_b, d} \text{ if } \left(|DIL_{(x, y)}^{t_b, d} - I_{(x, y)}^{t_a}| \leq |ERO_{(x, y)}^{t_b, d} - I_{(x, y)}^{t_a}| \right) \text{ SNR的改善}$$

[0283] 在典型的照明条件下,光子散粒噪声(传感器上的入射光子到达速率的统计变化)限制了检测系统的SNR。现代传感器具有足够的容量,其为每个有效的(active)平方微米大约1,700至大约1,900个电子。因此,当成像平板上的目标时,主要关心的不是用于成像目标的像素的个数,而是在传感器空间内被目标覆盖的面积。增加传感器的面积为成像目标改善SNR。

[0284] 可通过利用这样的照明条件捕获图像,来改善图像质量,在所述照明条件下光子噪声控制SNR(光子噪声 $=\sqrt{\text{信号}}$)而无需使传感器饱和(每帧中每个像素内可记录的光子的最大数目)。为了最大化SNR,通常使用图像平均技术。因为暗区的SNR比亮区的SNR低得多,这些技术用于处理具有显著亮度(或者颜色)差异的图像,如下列等式所示:

$$[0285] \quad (66) \quad \left(SNR_{\text{暗}} = \frac{SNR_{\text{亮}}}{\sqrt{\frac{I_{\text{亮}}}{I_{\text{暗}}}}} \right)$$

[0286] 其中I是在传感器处由电子流产生的平均电流。由于物质和光穿过电磁波谱的吸收/反射的不同,颜色被感知,对捕获的颜色的置信度将依赖于系统以高SNR记录强度的能力。图像传感器(例如,CCD传感器、CMOS传感器等)是本领域技术人员熟知的,在此不再详细描述。

[0287] 为了克服经典的SNR成像限制,成像系统可在图像获取期间进行成像平板的分析,并且基于该分析实时地调节照明条件和曝光时间。该过程在PCT公开号W02015/114121中描

述——其通过引用并入,并且通常被称为监督的高质量成像(SHQI)。该系统还可以在不同的颜色通道内为平板的不同亮度区域定制成像条件。

[0288] 对于图像的给定像素 x, y ,在当前的帧 N 期间获取的像素的SNR信息可与在之前或者随后获取的帧(例如, $N-1$ 、 $N+1$)期间获取的相同像素的SNR信息结合。作为示例,结合的SNR可由下式决定:

$$[0289] \quad (67) \quad \text{SNR}'_{x,y,N+1} = \sqrt{\text{SNR}_{x,y,N}^2 + \text{SNR}_{x,y,N+1}^2}$$

[0290] 利用新的获取更新图像数据后,获取系统能够预测最佳的下一个获取时间,其将根据环境约束最大化SNR(例如,在感兴趣的区域内每个像素的最低要求的SNR)。例如,平均非饱和条件中捕获的5张图像将促进暗区的SNR(最大强度的10%)提升 $\sqrt{5}$,当合并并在明亮的和暗的条件中捕获的两张图像的信息时,仅在两次获取中,最佳照明将促进暗区的SNR提升 $\sqrt{11}$ 。

[0291] 图像建模

[0292] 在一些情况中,当计算一个或者多个图像的像素之间的空间或者时间对比度时,给定图像的像素信息可能是不可用的,或者可能是弱化的(degraded)。例如,如果平板的图像没有在细菌生长之前的时间内被捕获(例如,平板没有在时间 t_0 或者此后短时间内成像),则不适用可能会发生。例如,当在时间 t_0 捕获图像,但是捕获的图像的像素不能准确地反映细菌生长之前的成像平板时,信号信息的弱化可能发生。这样的不精确性可能由不会在平板的随后时间序列图像中再次出现的时间伪像引起(例如,当平板首次被放入培育箱时,由于热冲击而在平板底部暂时形成的凝结)。

[0293] 在这样的情况中,不可用的或者弱化的图像(或者图像中的某些像素)可以利用平板的模型图像替换或者增强。模型图像可提供像素信息,其反映在不可用的或者弱化的图像的特定时间预期平板看起来如何。在时间 t_0 的模型图像的情况下,模型可以是平板的清晰的(plain)或者标准的图像,并且可使用三维成像/建模技术数学上构建。模型可包括物理设计参数(例如,直径、高度、容纳多种培养基的分隔物(divider)、塑料材料等)、培养基参数(例如,培养基的类型、培养基组成、培养基高度和厚度等等)、照明参数(例如,光源的角度、光源的颜色或者波长(一个或多个)、背景的颜色等等)以及定位参数(例如,平板在成像室中的位置)中的每一个,从而产生尽可能真实的模型。

[0294] 在弱化的图像的情况下,当像素信息不如图像中剩余部分那么锐利时(例如,由于下面的凝结阻碍了一些光穿过平板,并且因此使平板的具有凝结的部分轻微地较不透明),可使用信号恢复来锐化图像中弱化的像素特征,来完成弱化的图像的增强。信号恢复可包括确定图像剩余部分的强度信息,鉴定强度信息的中值强度,并且随后使用图像剩余部分的中值强度替换图像的较小锐度区域的强度信息。

[0295] 应用

[0296] 本公开主要基于在不同稀释度的盐水中实施以模拟典型的尿报告量(CFU/ml桶组(Bucket group))的测试。用于每个隔离物的悬液被调节至0.5马克法兰氏标准(McFarland Standard),并且用于在BD真空采尿管(Vacutainer tube)(目录号364951)中的估计 $1 \times$

10^6 、 1×10^5 、 5×10^4 、 1×10^4 、 1×10^3 和 1×10^2 CFU/ml的悬液下制备稀释物。使用Kiestra Inoqula (WCA1),使用标准尿液划线模式——4#Z字形(每平板分散0.01ml)处理样本管。

[0297] 使用ReadA Compact处理平板(35°C,非CO₂)并且在总共48小时的孵育时间内,开始的24小时每两小时成像一次,并且在第二个24小时每6小时成像一次。在1小时,孵育时间被输入作为首次读取,允许的边限设置为+/-15分钟。对于在2-24小时的下次读取,设置为每2小时,允许的边限为+/-30分钟。对于读取24-48小时,设置为每6小时,允许的边限为+/-30分钟。在纯可行性研究后,将其改变以消除允许的边限。这样做以在希望的18-24小时的范围改善图像获取。

[0298] 在其它情况下,可在48小时的跨度内获得图像——对于前24小时,以2小时间隔,对于接下来的24小时,以6小时间隔。在这样的情况下,在48小时的跨度内将获得总共17个图像,包括自时间 t_0 (0小时)获得的图像。

[0299] 利用已知的目标像素大小、归一化的照明条件和每个像素的每个波段(band)的高信噪比,纠正所有获取的图像的镜头几何相差和色差,光谱平衡所有获取的图像。用于本文描述的方法和系统中的合适摄像机对本领域技术人员来说是已知的,本文不再详细描述。作为示例,当菌落的直径在100 μ m的范围内并且具有足够的对比度时,使用400万像素的摄像机去捕获90mm平板图像应当允许计数(enumeration)上至30菌落/mm²的局部密度(>10⁵CFU/板)。

[0300] 使用下列的培养基评估在其上生长的菌落的对比度:

[0301] TSAII 5%绵羊血(BAP):广泛应用于尿培养物的非选择性培养基。

[0302] BAV:基于菌落形态和溶血,用于菌落计数和推定的ID。

[0303] 麦康凯II琼脂(MAC):用于最常见的革兰氏阴性UTI病原体的选择性培养基。MAC用于产乳糖菌落的分化。MAC也抑制变形杆菌属的群集。BAP和MAC被普遍用于尿培养物。由于对一些革兰氏阴性物的部分抑制,一些培养基不被推荐用于菌落计数。

[0304] 粘菌素萘啶酮酸琼脂(CNA):用于最常见的革兰氏阳性UTI病原体的选择性培养基。CNA不像MAC通常用于尿培养物,但是如果发生革兰氏阴性菌落的过度生长,则其可帮助鉴定菌落。

[0305] 定位显色琼脂(CHROMA):广泛用于尿培养物的非选择性培养基。CHROMA基于菌落颜色和形态,用于菌落计数和ID。大肠杆菌和肠球菌通过该培养基鉴定,并且不需要确证检验。由于成本的原因,CHROMA使用少于BAP。对于混合样品,也使用CLED培养基。

[0306] 胱氨酸乳糖电解质缺乏(CLED)琼脂:基于乳糖发酵,用于菌落计数和尿病原体的推定ID。

[0307] 样本处理BD Kiestra™ Inoqula™用于自动化处理细菌学样本,以能够实现标准化并且确保一致的和高质量划线。BD Kiestra™ Inoqula™样本处理器使用磁滚珠技术,使用可定制的模式在培养基平板上划线。磁滚珠的直径是5mm。

[0308] 图17图解了在检索显色琼脂(上图)和血琼脂(下图)培养基二者上的摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)生长中的对比度收集算法性能的实例。显色琼脂和BAP都是广泛应用于微生物实验室的非选择性生长培养基。图17的中间图像的每个都呈现了由来自平板上方的光照明(顶部照明)的成像平板。左边的图像示出了中间图像的相应空间对比度。空间对比度基于1毫米中值内核(median kernel)。最后,右边的图像示出了中间图像的时间对

比度。时间对比度是由在0小时 (t_0) 和12小时 (t_x) 孵育之间捕获的图像编译而成的,在每次图像捕获时间采用不同的光照条件(不同的颜色通道、照明设置等等)。

[0309] 如图17所示,当处理半透明菌落时,特别是在边缘过渡较小时,局部对比度具有其局限性,这是因为单独使用空间对比度算法,只有强对比度的汇合区域可从图像选取。空间对比度可能不能选取目标。从图17中也可明显的,时间对比度对于隔离的菌落是有效的。

[0310] 图17(特别是底部的血琼脂图像)也强调了单独使用空间对比度检测在透明培养基上生长的问题。在透明情况上打印的油墨具有非常强的边缘,并且因此具有强的空间对比度。这最终使得任何其它空间对比度非常难以被看到,这是因为菌落不具有如此强的限定的边缘。因此,本公开中,时间对比度与空间对比度结合使用具有可观的益处。

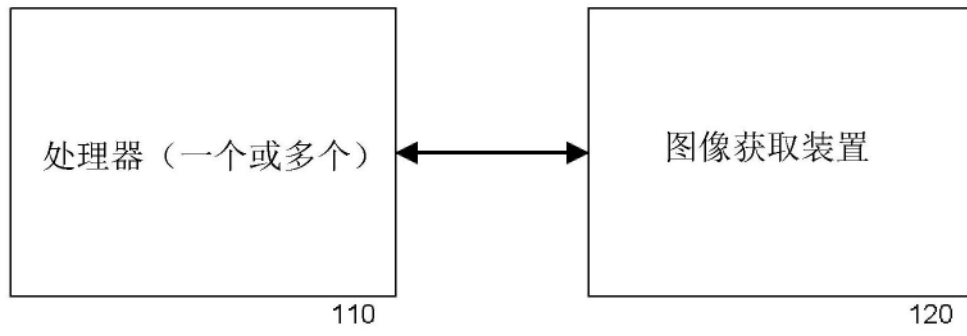
[0311] 最终,上述记载的对比度确定的结果是用于快速检测和鉴定成像的培养基中菌落的方法可被自动化。该自动化的方法提供了超过可相比的手动方法的显著优势。

[0312] 图18示出了一对流程图,其比较了自动测试过程1800的时间线(例如,图2中的程序200)与可相比的手动实施的测试过程1805的时间线。每个过程都开始于实验室接收用于测试的样本1810、1815。每个过程随后进行孵育1820、1825,在此期间样本可被多次成像。在自动化的过程中,在孵育大约12小时后,进行自动化评估1830,在该时间之后,可明确地确定在样本中是否没有生长(或者正常的生长)1840。如图17的结果所示,在自动化过程中时间对比度的使用很大程度上提高了检测菌落的能力——即使在仅12小时之后。与此相反,在手动过程中,直到进入孵育过程将近24小时,才可以进行手动的评估1835。只有在24小时后才能明确地确定在样本中是否没有生长(或者正常的生长)1845。

[0313] 自动化过程的使用还允许更快的AST和MALDI测试。自动化过程中的这样的测试1850可在初评1830之后不久开始,并且结果可通过24小时标记获得1860和报告1875。与此相反,手动过程中的这样的测试1855通常直到接近36小时标记时才开始,并且在数据可被检查1865和报告1875之前耗费额外的8到12小时来完成。

[0314] 总之,手动测试过程1805示出了耗费上至48小时,需要18-24小时的孵育时期,只有在此之后才能评估平板的生长,并且也没有办法追踪样品已经孵育了多久。与此相反,因为自动化测试过程1800可检测菌落之间甚至相对很差的对比度(与背景以及互相之间比较),并且可以进行成像和孵育,而不需要微生物学家必须保持定时追踪,在样本可被鉴定并且准备用于进一步的测试(例如,AST, MALDI)之前只需要12-18小时的孵育,并且整个过程可在大约24小时内完成。因此,本公开的自动化过程,在本文描述的对比度处理的帮助下,提供了样品的较快测试,而对测试结果的质量和准确性没有不利的影响。

[0315] 虽然已经参考具体实施方式对本公开进行了描述,但是应当理解这些实施方式仅是对本公开的原理和应用的说明。因此,应当理解,可对说明性的实施方式进行多种改进,并且可设计其它的布置,而不脱离由所附的权利要求所限定的本公开的精神和范围。



100

图1

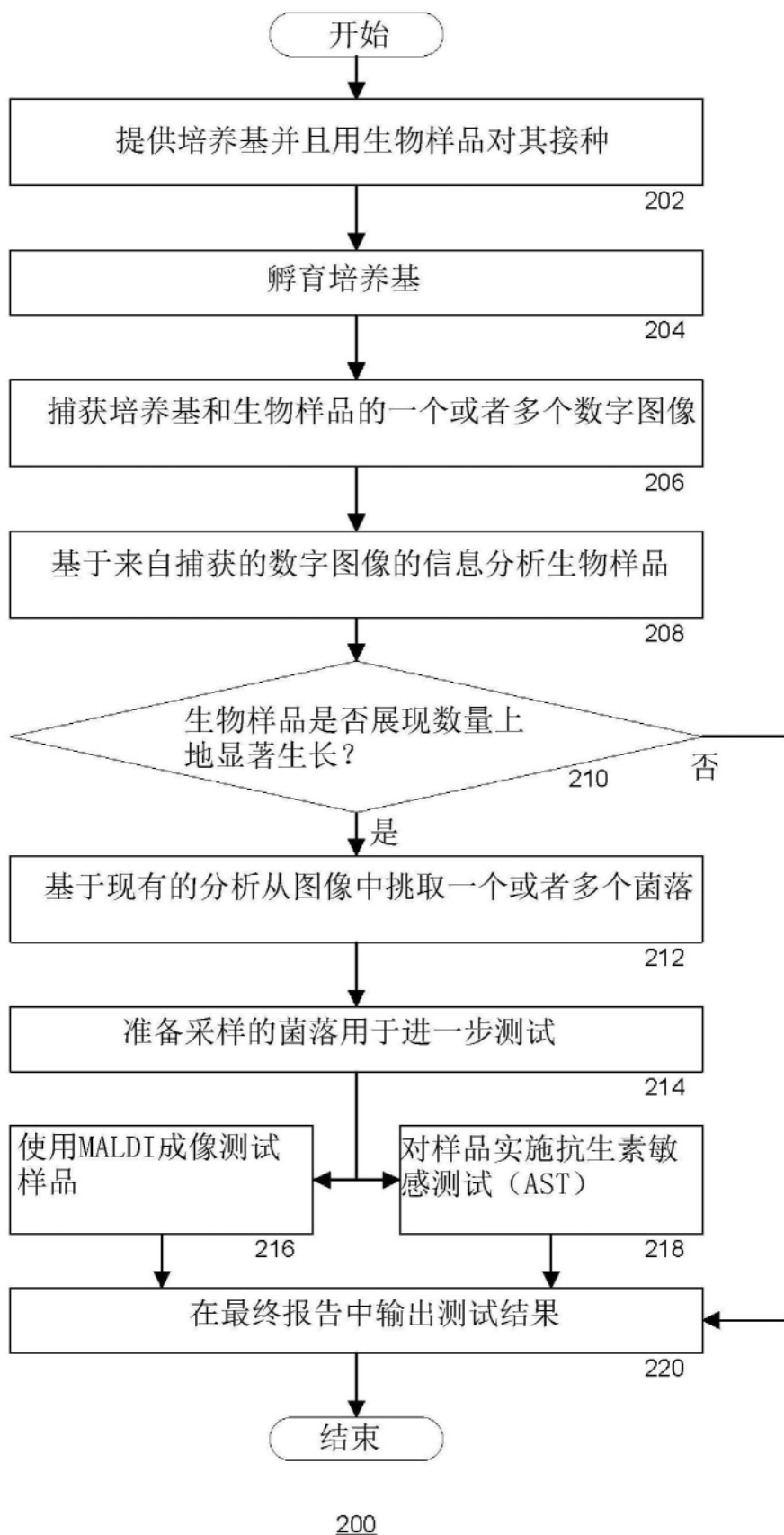


图2

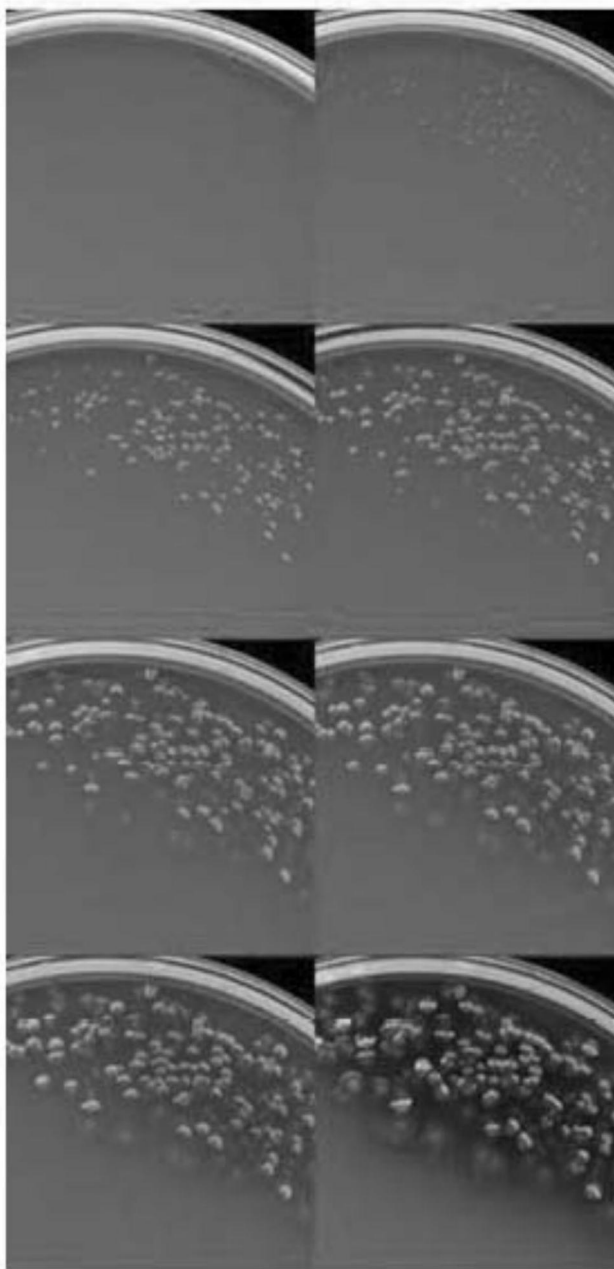


图3A

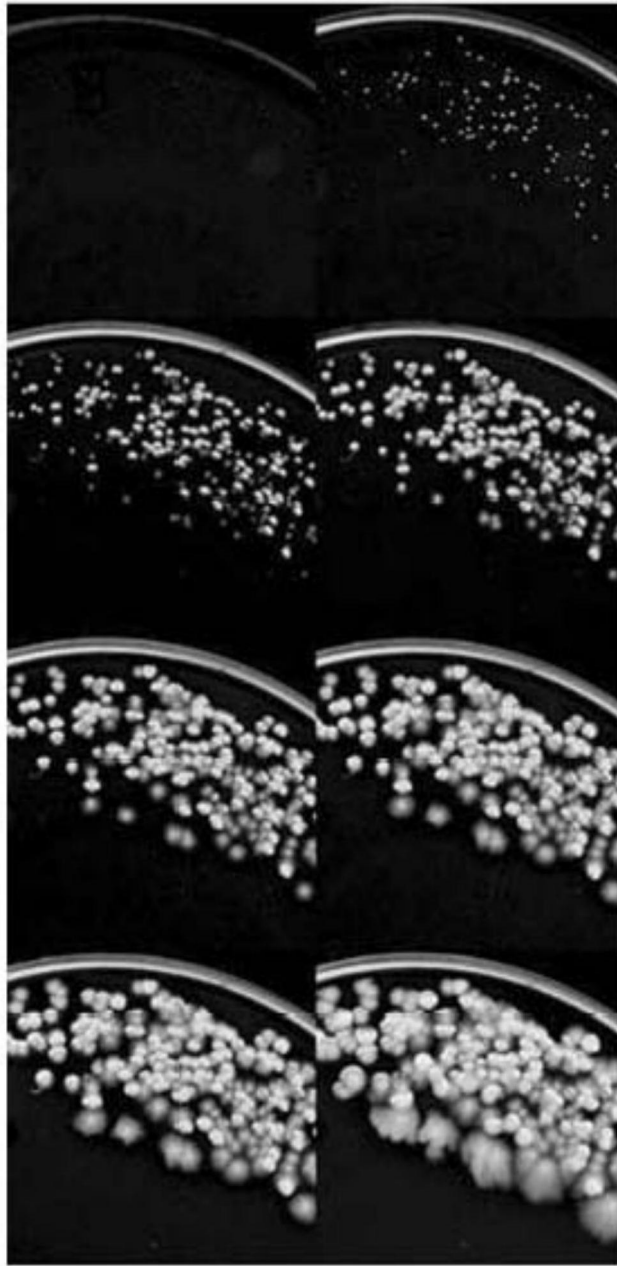


图3B

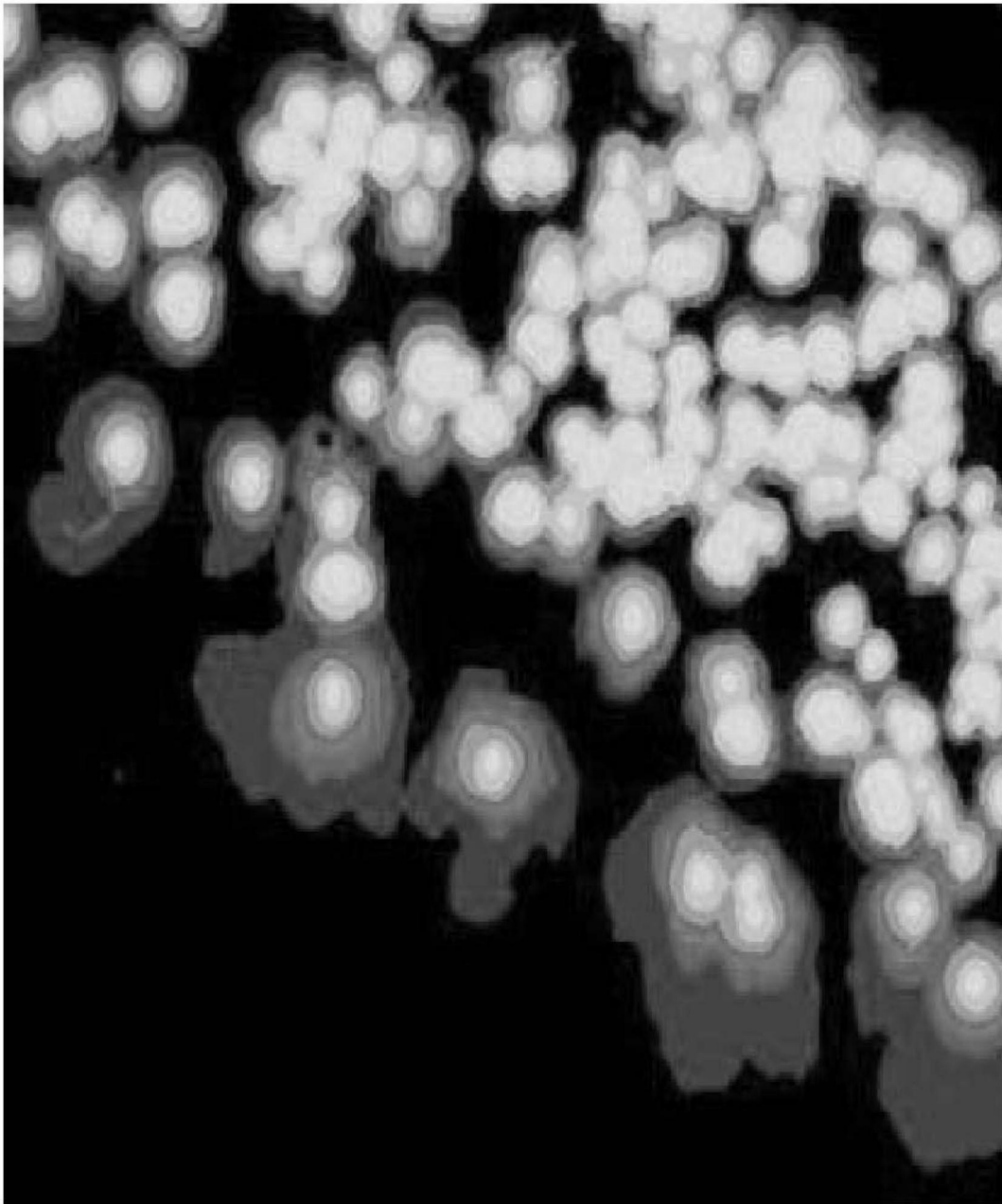


图3C

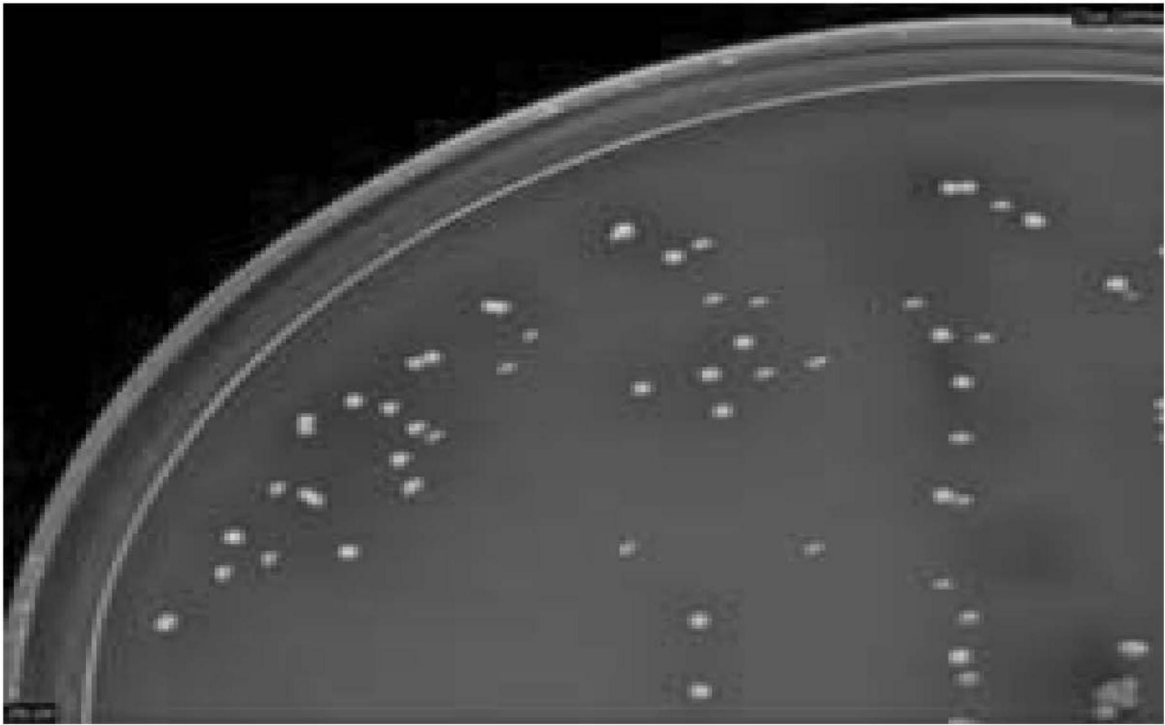


图3D

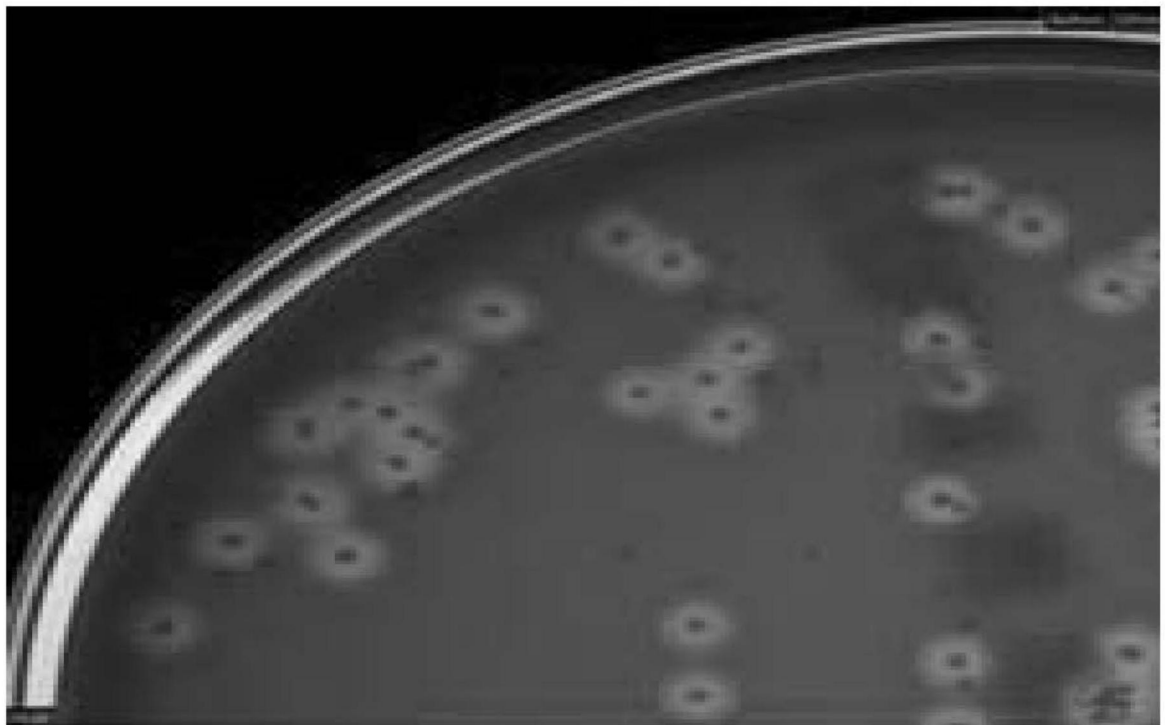


图3E

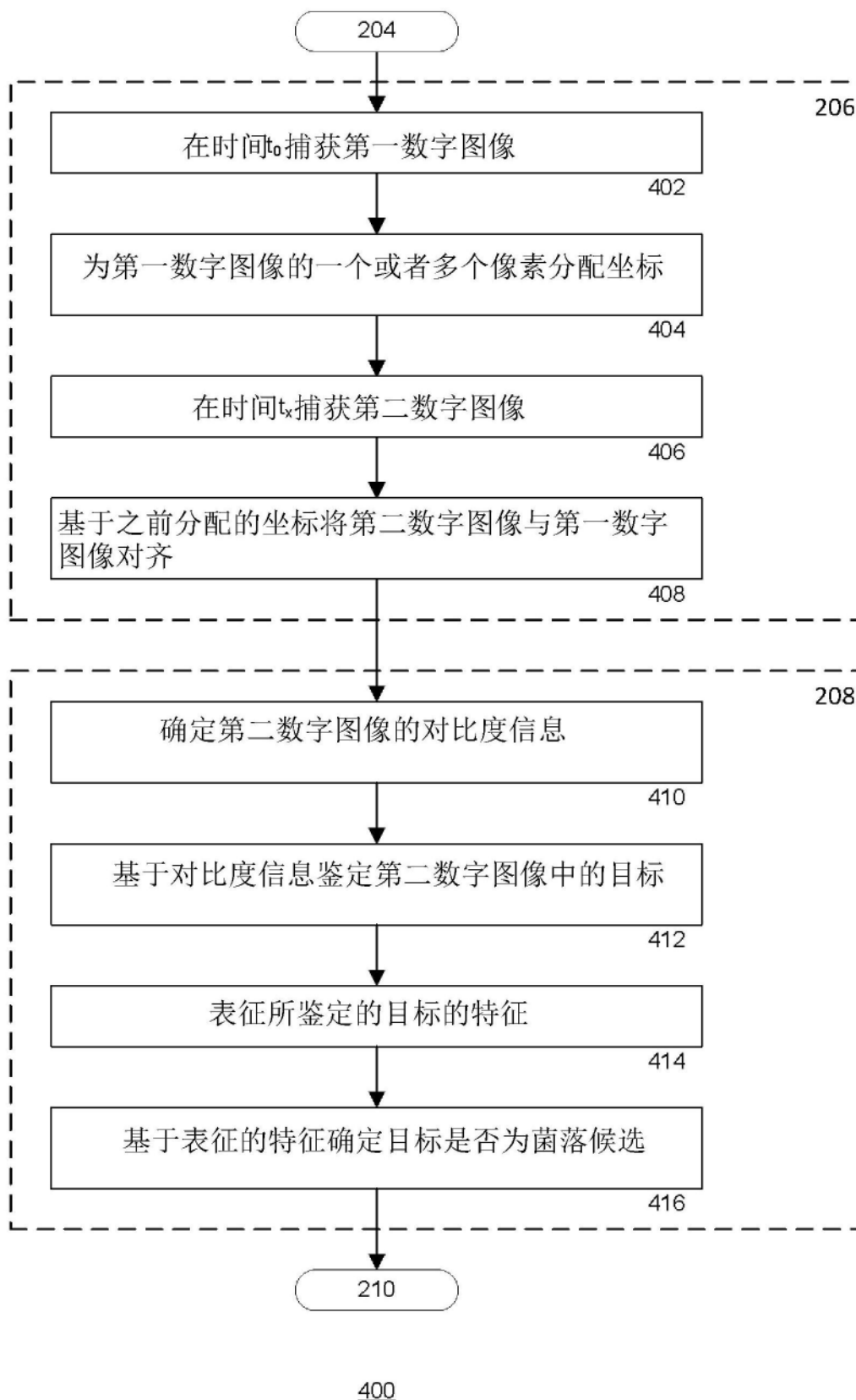
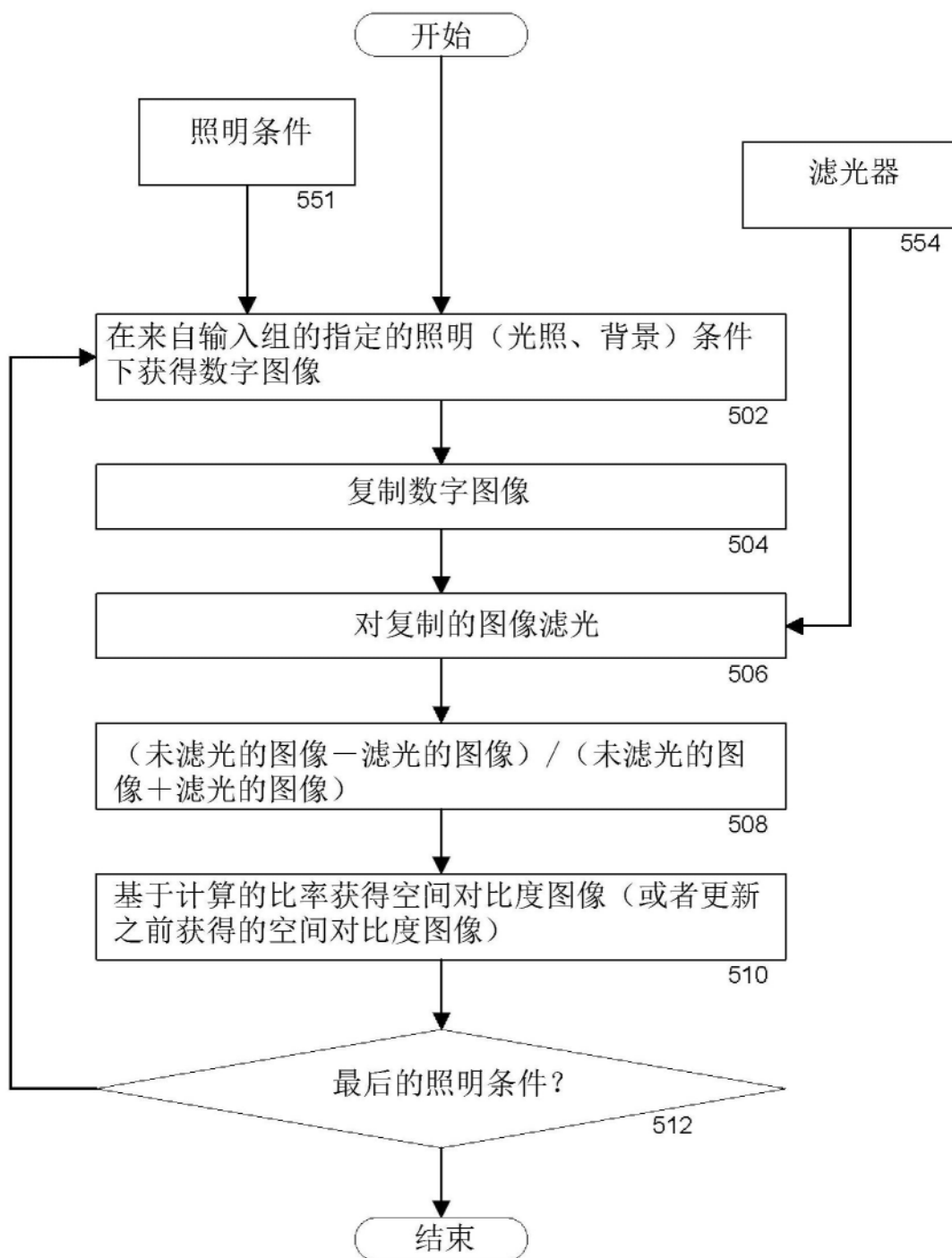
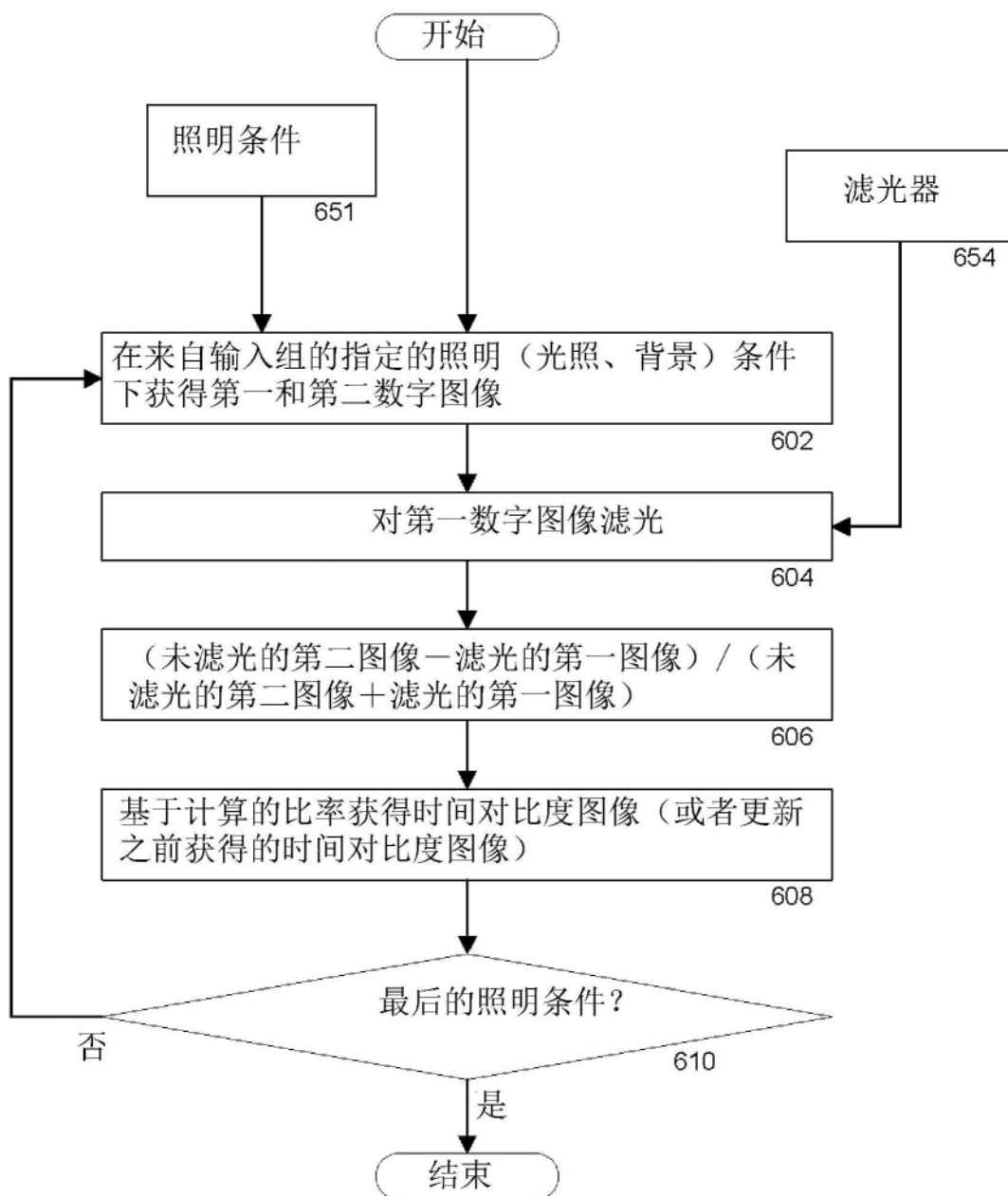


图4



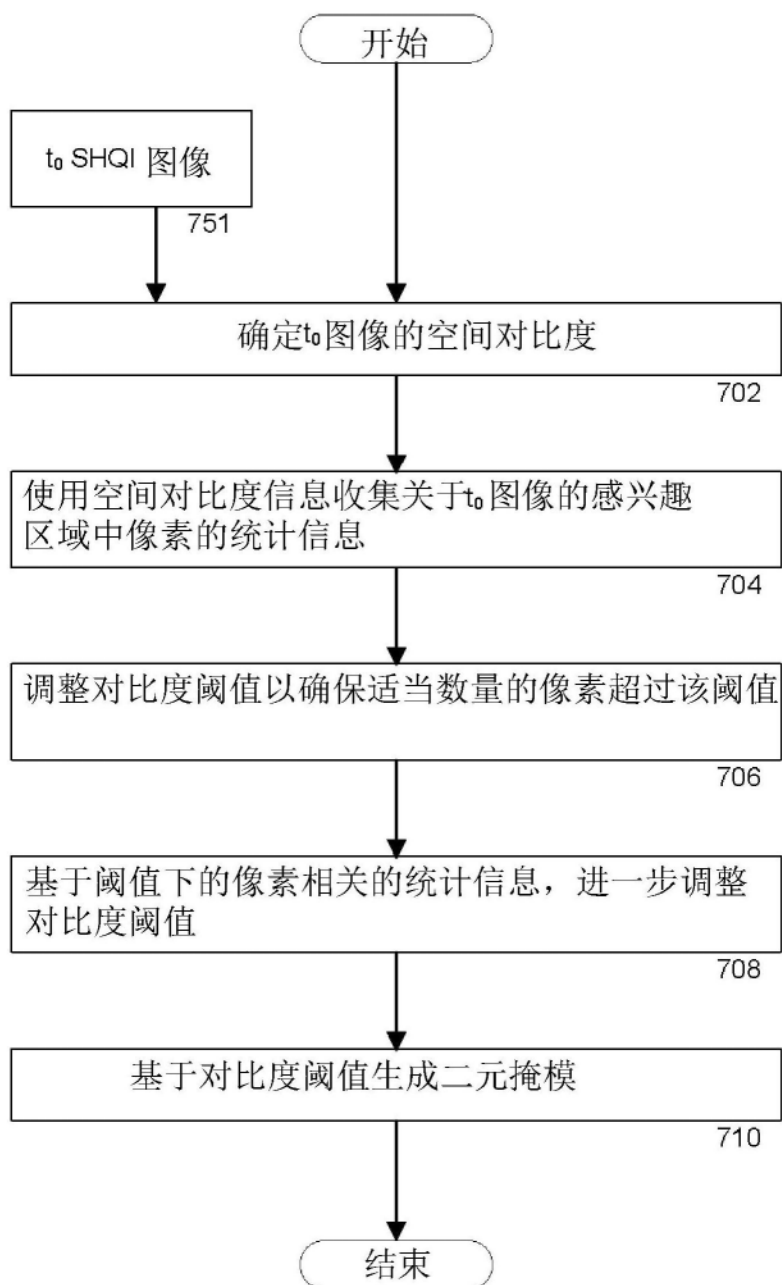
500

图5



600

图6



700

图7

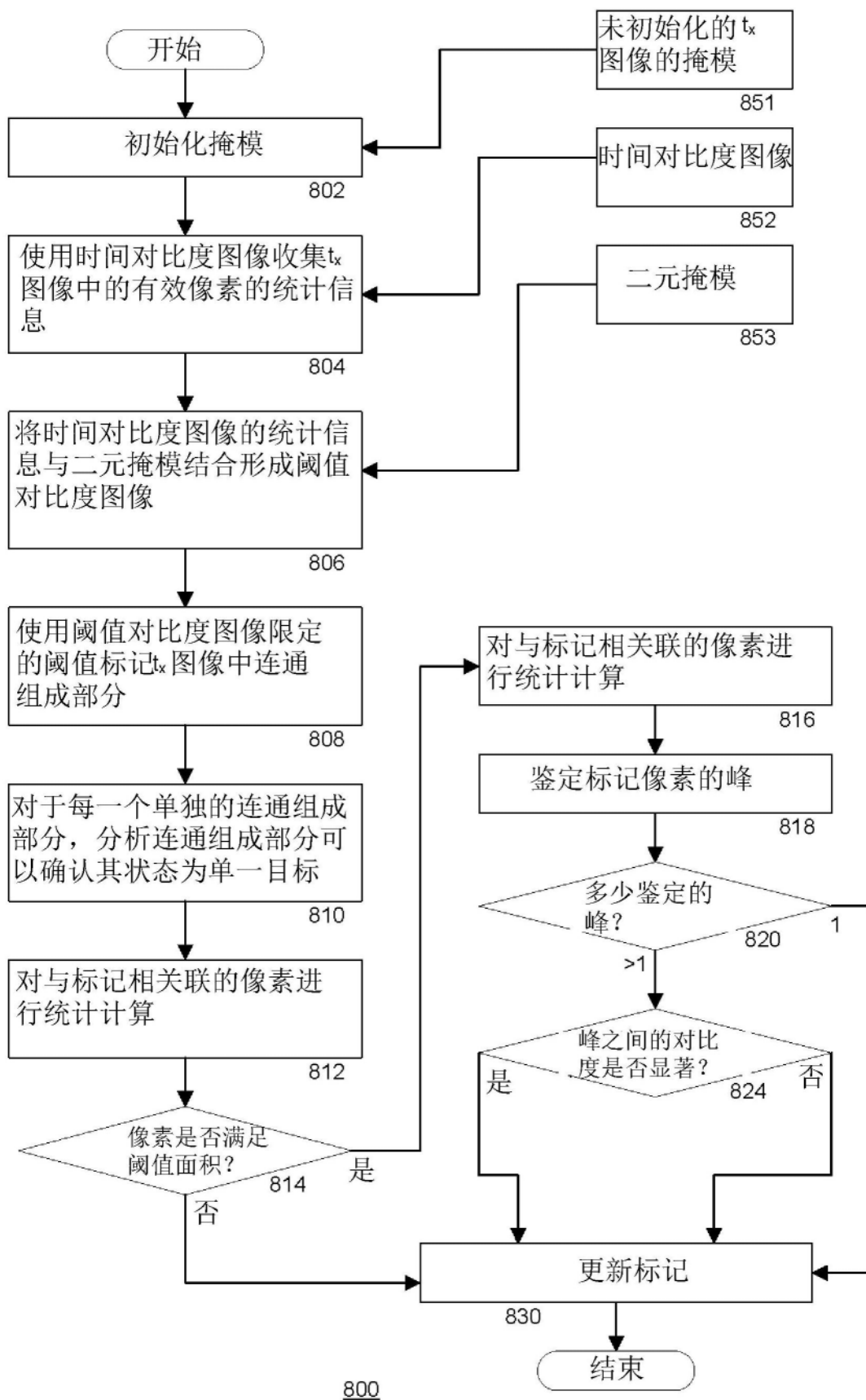


图8

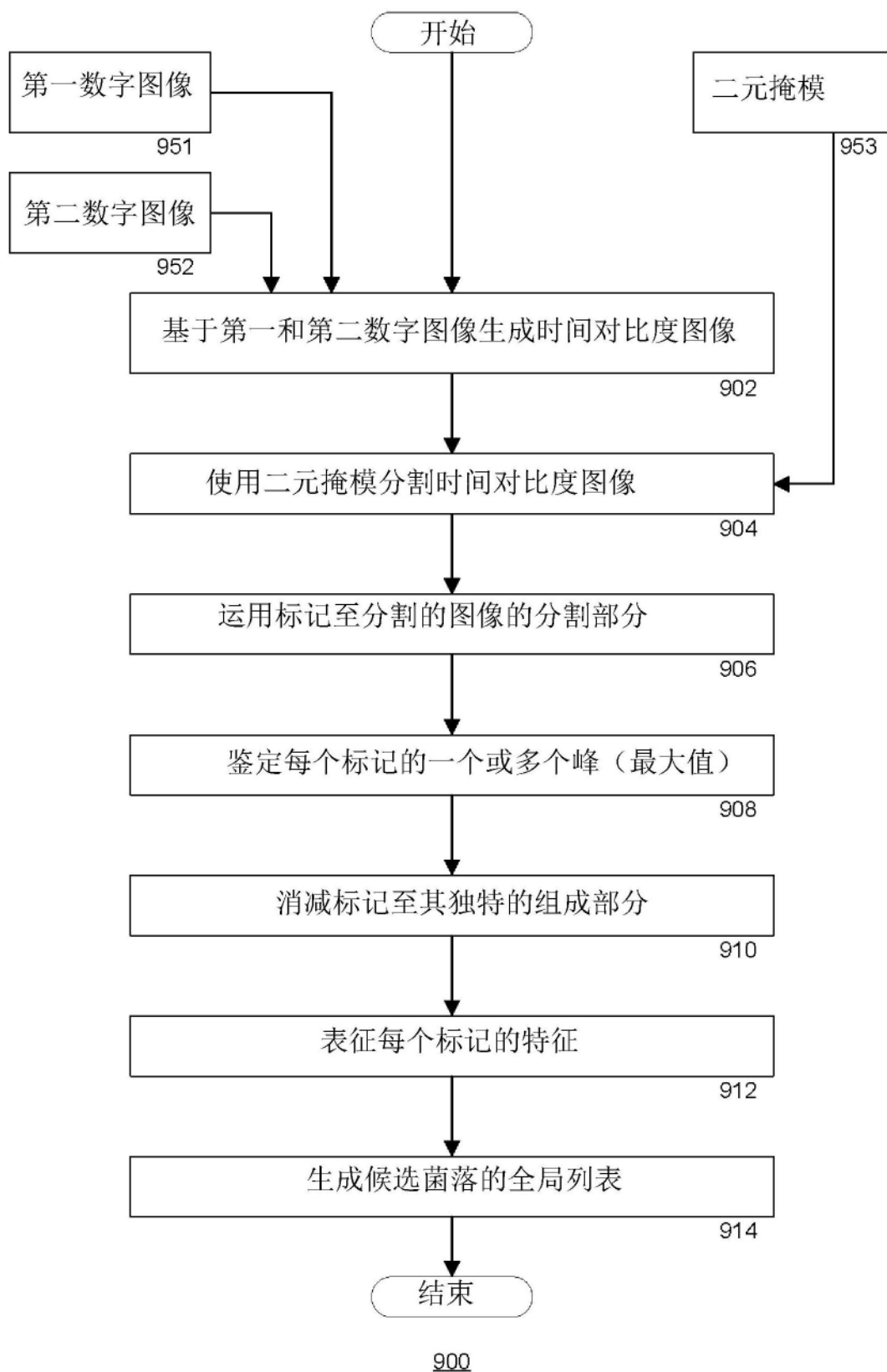


图9

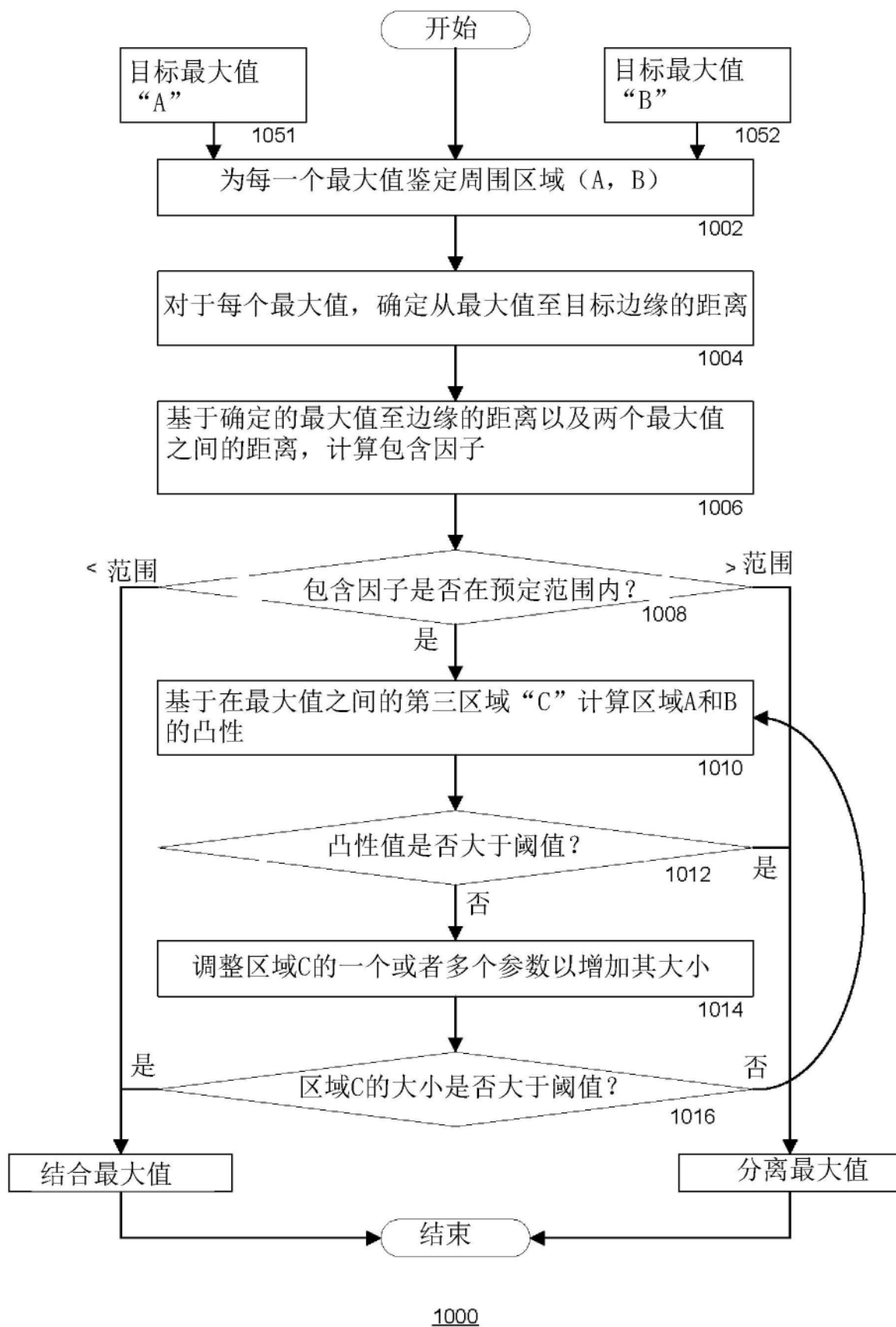


图10

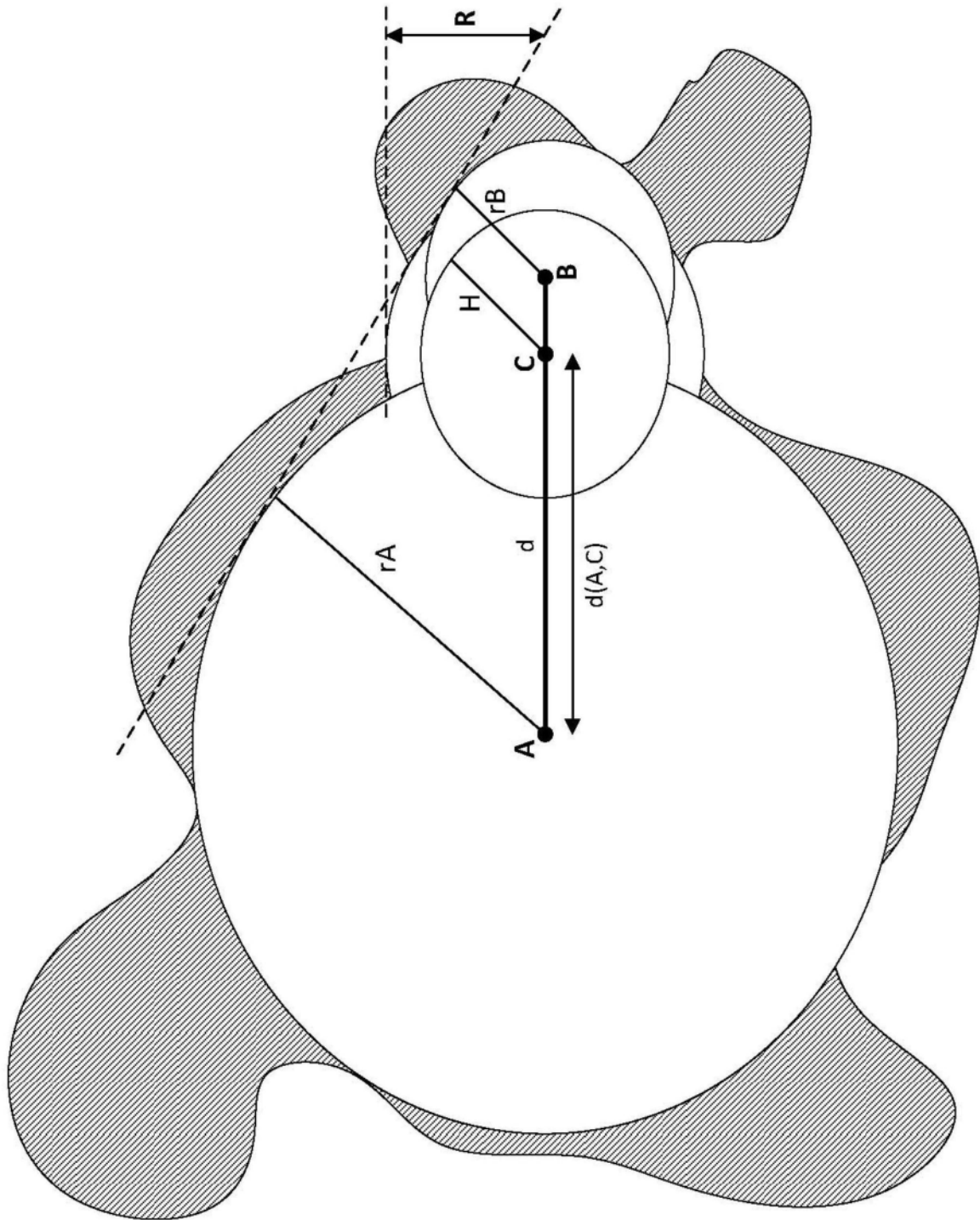


图11

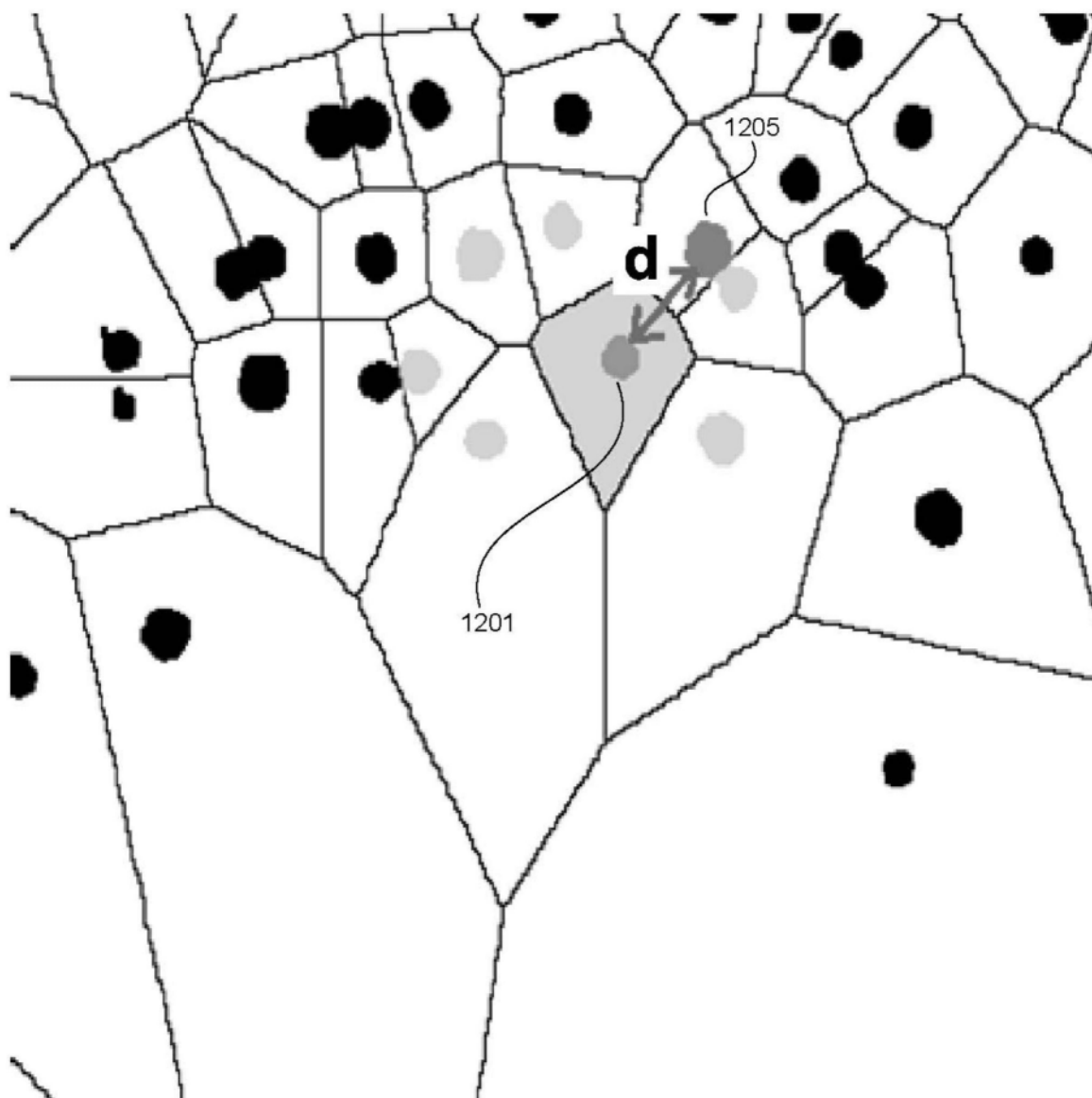


图12

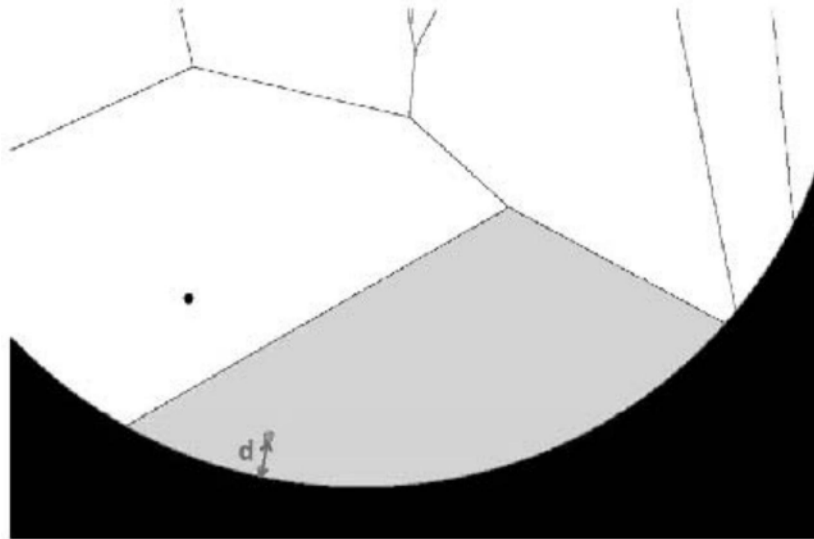


图13A

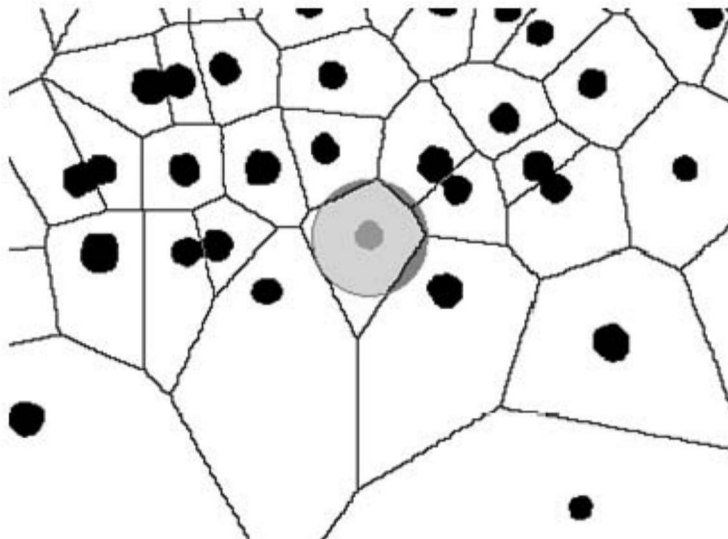


图13B

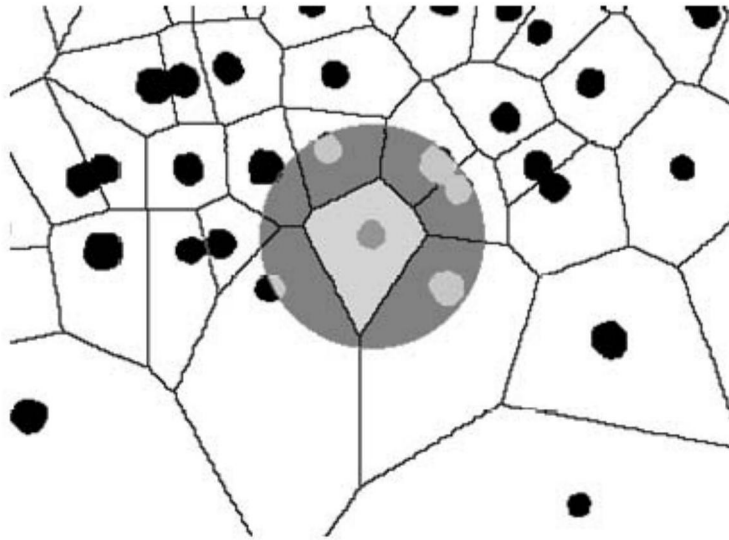


图13C

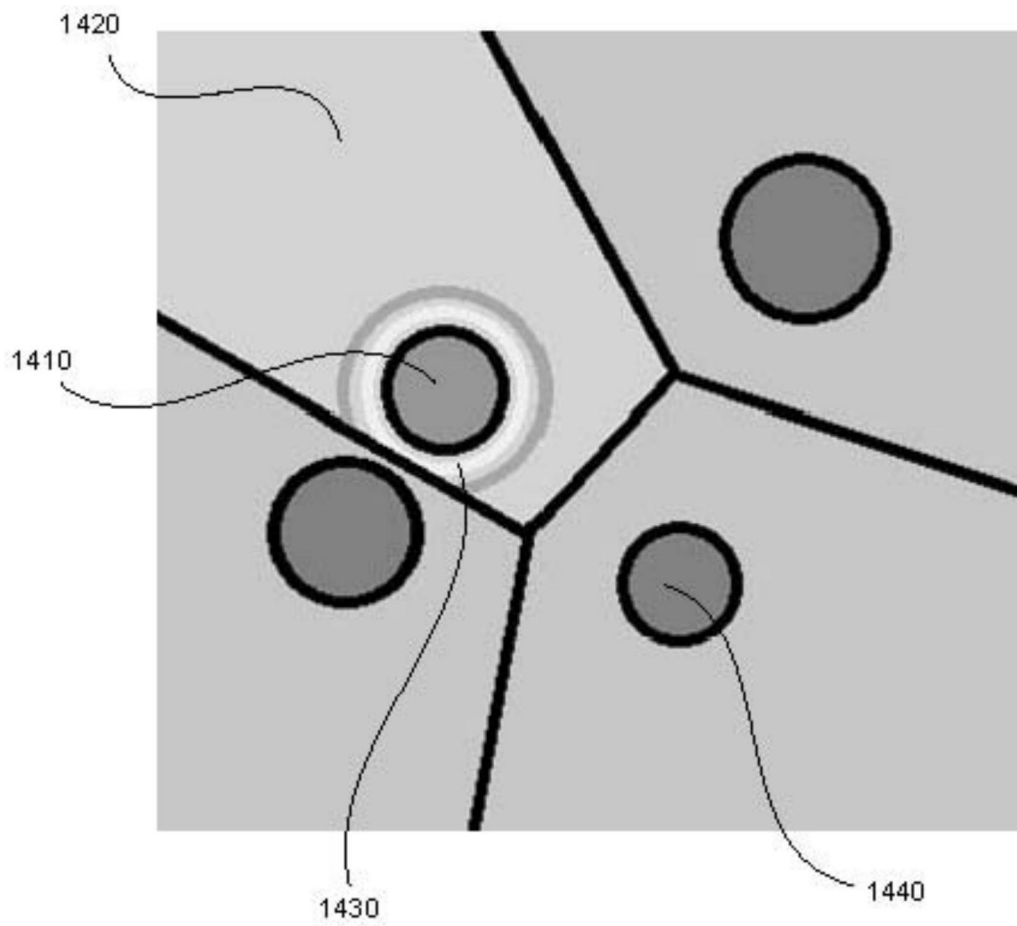


图14

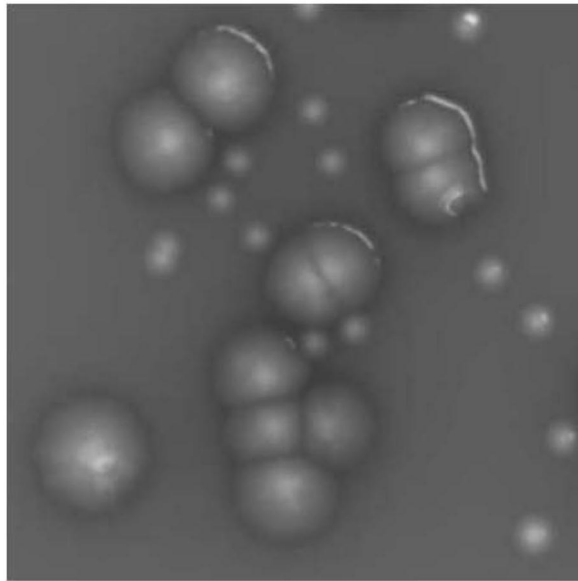


图15A

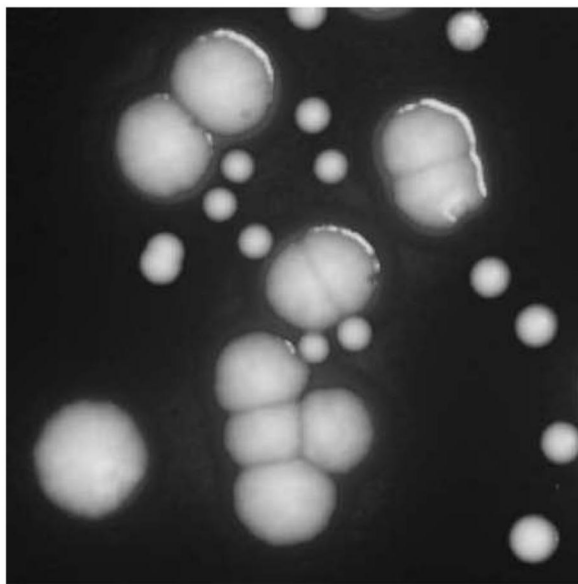


图15B

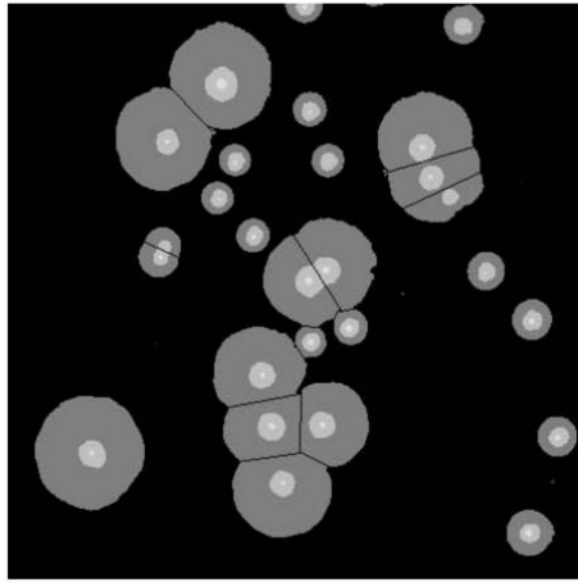


图15C

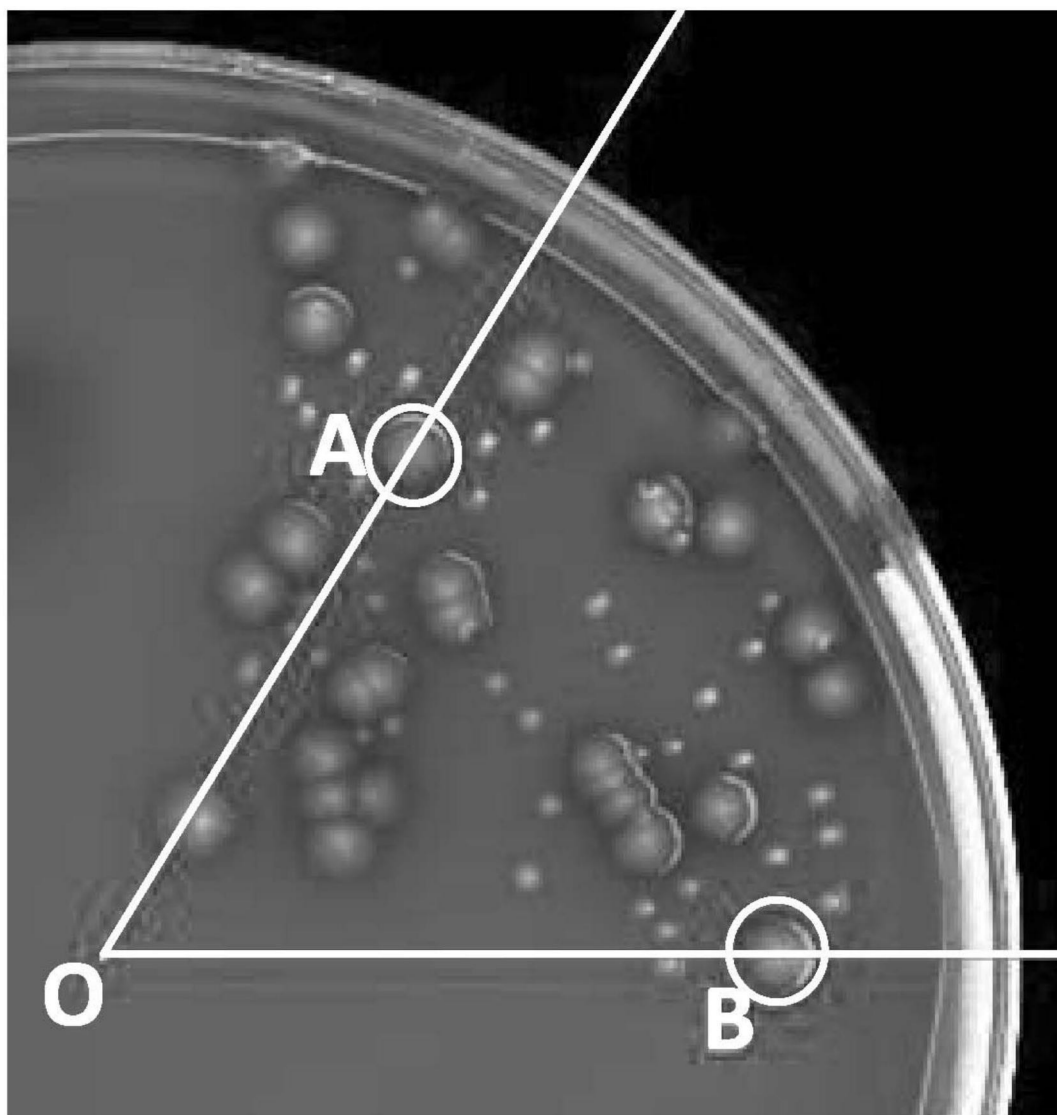


图16A

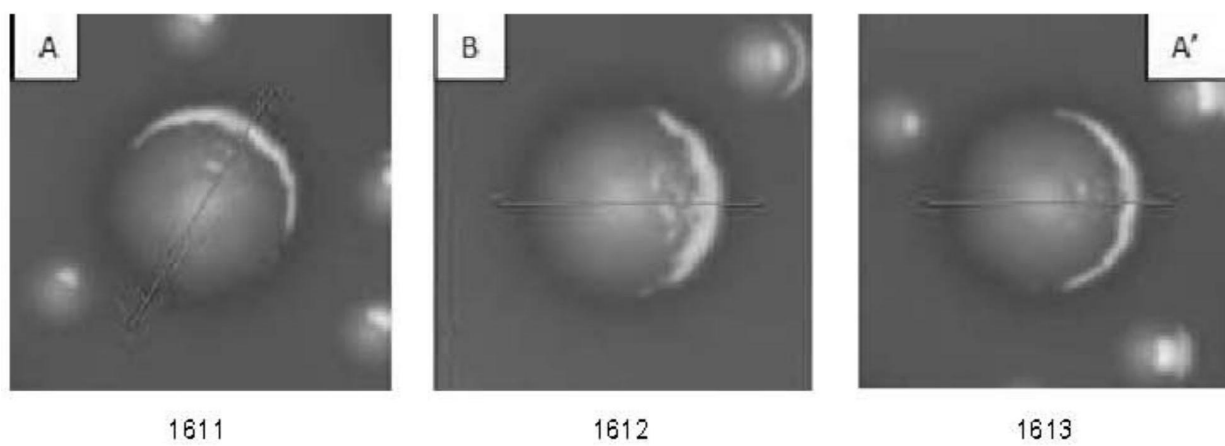


图16B

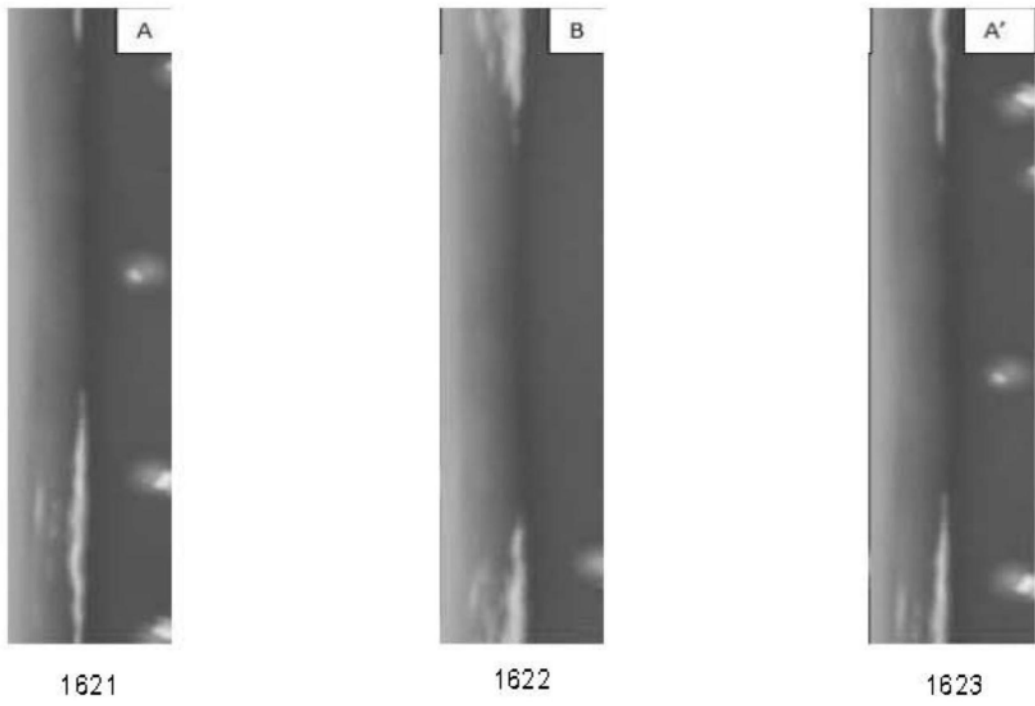


图16C

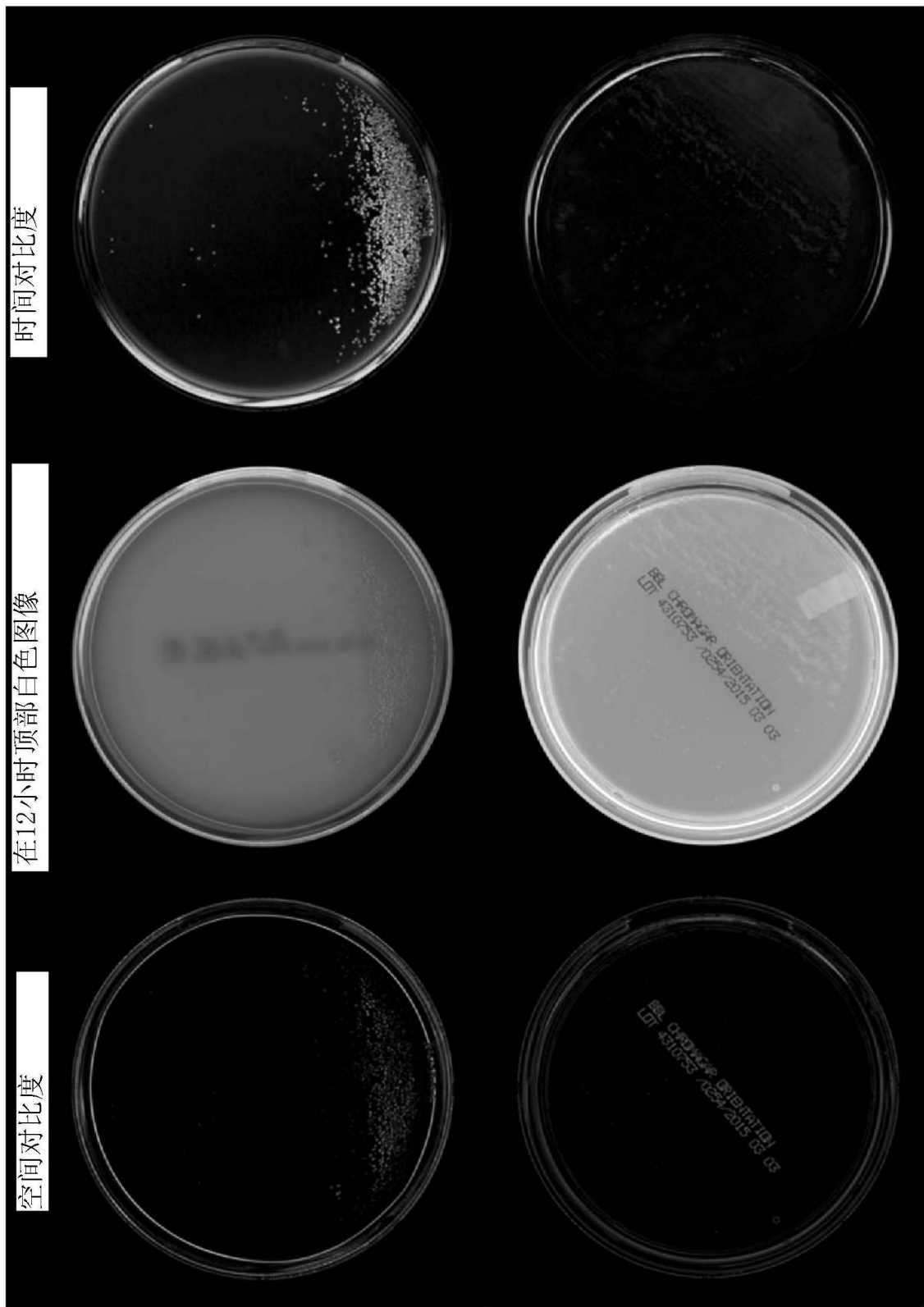


图17

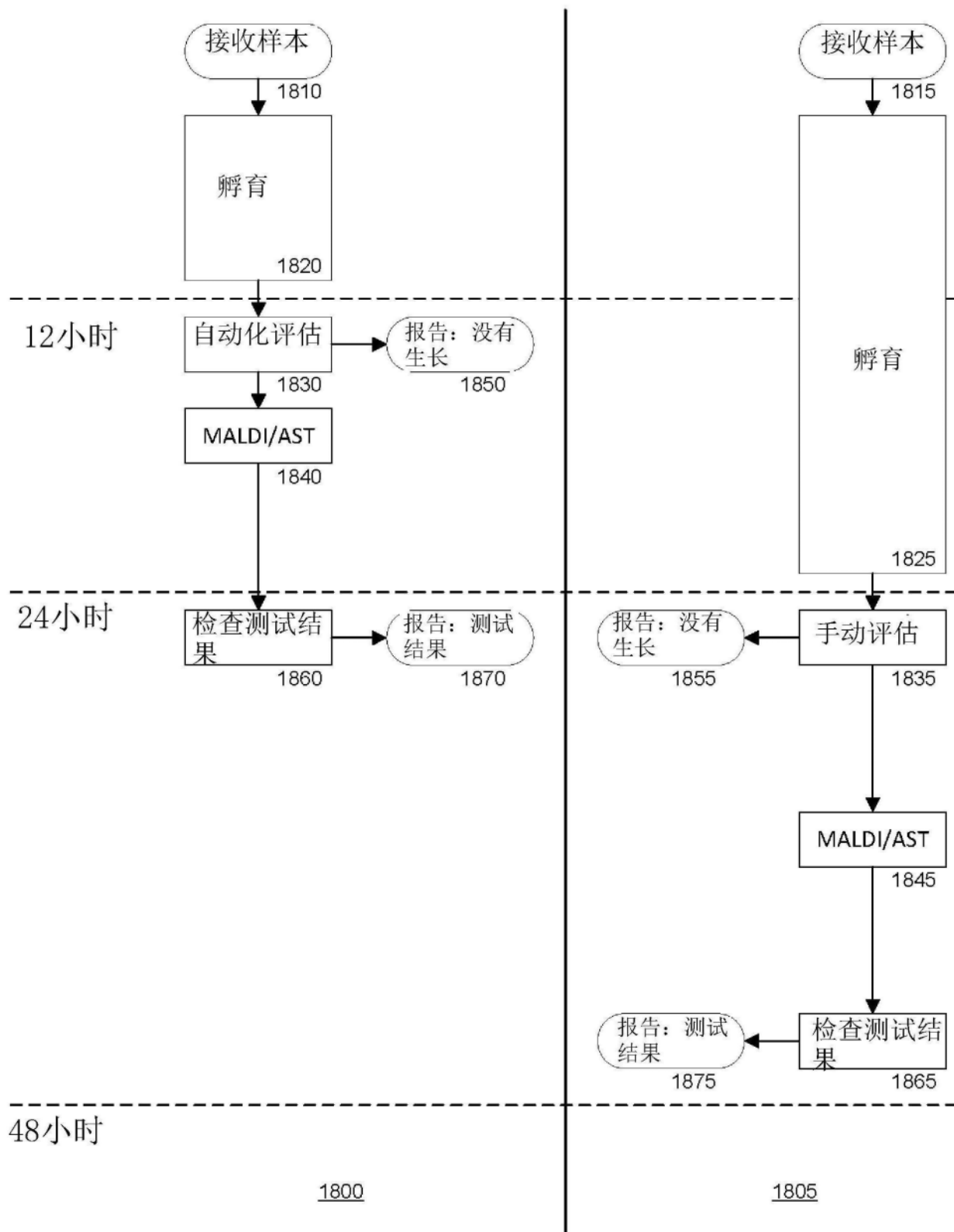


图18