



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104871177 B

(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 201380066457.6  
 (22)申请日 2013.12.13  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 104871177 A  
 (43)申请公布日 2015.08.26  
 (30)优先权数据  
 61/739,789 2012.12.20 US  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2015.06.18  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2013/074887 2013.12.13  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02014/099644 EN 2014.06.26  
 (73)专利权人 3M创新有限公司  
 地址 美国明尼苏达州  
 (72)发明人 菲利普·A·博莱亚  
 迈克尔·G·威廉姆斯  
 (74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
 责任公司 11219  
 代理人 张爽 郭国清

(51)Int.Cl.  
 G06K 9/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 US 2005053266 A1,2005.03.10,  
 US 2012094327 A1,2012.04.19,  
 US 2012094327 A1,2012.04.19,  
 US 2005053266 A1,2005.03.10,  
 CN 1717579 A,2006.01.04,  
 CN 1717693 A,2006.01.04,  
 US 2006057558 A1,2006.03.16,  
 US 2004092001 A1,2004.05.13,  
 XP055102418.Interpretation Guide-3M  
 Petrifilm E.coli and Coliform Count  
 Plates.《[http://jornades.uab.cat/  
 workshopmrama/sites/  
 jornades.uab.cat/workshopmrama/files/  
 Petrifilm\\_guides.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guides.pdf)》.2008,第1-6页.

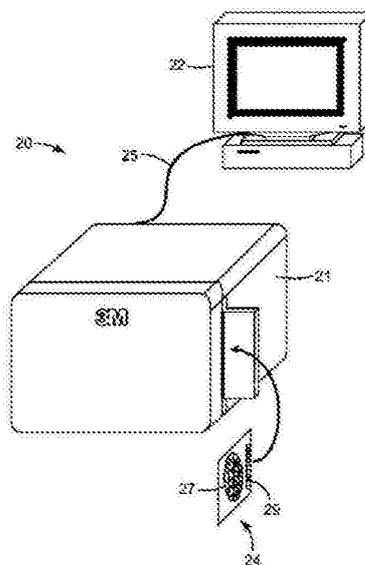
审查员 唐文俊

权利要求书2页 说明书19页 附图10页

(54)发明名称  
 检测产气微生物菌落的方法

### (57)摘要

本发明提供了第一方法,包括使用成像装置来产生培养装置的多个图像,分析第一图像以识别在第一位置处的微生物菌落,分析第二图像以识别在第二位置处的气泡,并确定第一位置是否接近第二位置。第二方法包括分析培养装置的图像,以检测气泡并根据与每个气泡相关联的尺寸参数来分类气泡。第三方法包括分析培养装置的图像的第一区域,以检测第一气泡数目;分析图像的第二区域,以检测第二气泡数目,并且比较第一气泡数目与第二气泡数目。



1. 一种检测产气微生物菌落的方法,该方法包括:

使用成像装置来产生薄膜培养装置的第一图像,所述培养装置包括具有透明膜覆盖片的前侧和具有半透明基材的背侧;

其中所述第一图像是在对所述装置的前侧提供照明时产生的;

其中所述培养装置包括由微生物转化为能够通过第一颜色观察的第一产物的指示剂化合物;

其中所述培养装置包括能够由第一类微生物转化为气体的营养物质;

使用所述成像装置来产生所述薄膜培养装置的第二图像,其中所述第二图像是在对所述装置的背侧提供照明时产生的;

分析所述第一图像,以识别在所述培养装置中的第一位置处的微生物菌落;

分析所述第二图像,以识别在所述培养装置中的第二位置处的第一气泡;以及

确定所述第一位置是否在距所述第二位置的预定距离内。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一图像是在以前侧照明与背侧照明的第一比率照射所述装置时产生的,其中所述第二图像是在以前侧照明与背侧照明的第二比率照射所述装置时产生的,所述第二比率低于所述第一比率。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一气泡包括第一周边,其中分析所述第二图像以识别第一气泡包括识别与所述第一周边相关联的暗环带。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中分析所述第二图像以识别第一气泡包括计算所述第一气泡的尺寸参数。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中分析所述第二图像以识别第一气泡包括分析围绕所述第一气泡的第一预定区域,以检测第二气泡。

6. 根据权利要求4或5所述的方法,该方法还包括比较所述第一气泡的尺寸参数与第二气泡的尺寸参数。

7. 根据权利要求1至5中的任一项所述的方法,所述方法还包括基于在距所述第二位置的预定距离内的所述第一位置,确定所述第一气泡与所述微生物菌落相关联。

8. 一种包括计算机可读指令的计算机可读介质,所述计算机可读指令在由处理器执行时致使包括所述处理器的图像分析系统:

分析薄膜培养装置的第一图像,所述培养装置具有前侧和与所述前侧相背对的背侧;

其中所述第一图像是在对所述装置的前侧提供照明时产生的;

其中分析所述第一图像包括识别在所述培养装置中的第一位置处的微生物菌落;

分析所述薄膜培养装置的第二图像;

其中所述第二图像是在对所述装置的背侧提供照明时产生的;

其中分析所述第二图像包括识别在所述培养装置中的第二位置处的气泡;以及

确定所述第一位置是否在距所述第二位置的预定距离内。

9. 一种对薄膜培养装置中的气泡进行分类的方法,该方法包括:

分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测所述第一区域中的第一气泡数目;

分析所述图像的第二区域,以检测所述第二区域中的第二气泡数目;

比较所述第一气泡数目与所述第二气泡数目;

基于小于所述第二气泡数目的所述第一气泡数目,确定所述第一区域是可疑区域;以及

基于所述可疑区域中大于在所述第二区域中检测到的非生物成因气泡的气泡尺寸,将所述可疑区域中的所述气泡分类为生物成因气泡。

10. 根据权利要求9所述的方法,该方法还包括:

分析所述图像的第三区域,以检测所述第三区域中的第三气泡数目;以及比较所述第一气泡数目或所述第二气泡数目与所述第三气泡数目。

11. 根据权利要求9或权利要求10所述的方法,该方法还包括:

分析所述图像,以检测所述培养装置的生长区域中的气泡;以及将多个所述气泡分类,其中将所述多个气泡分类包括根据与所述多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。

12. 根据权利要求9或10所述的方法,其中所述第一区域和所述第二区域具有相同的预定尺寸。

13. 根据权利要求9或10所述的方法,其中所述第一区域和所述第二区域部分地重叠。

14. 根据权利要求9或10所述的方法,其中:

所述方法还包括分配所述非生物成因气泡的最大尺寸参数值,并且

将所述可疑区域中的气泡分类为生物成因气泡包括:

基于所述非生物成因气泡的最大尺寸参数值的设定百分比,设定阈值;以及

基于所述可疑区域中大于所述阈值的气泡尺寸,将所述可疑区域中的所述气泡分类为生物成因气泡。

## 检测产气微生物菌落的方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2012年12月20日提交的美国临时专利申请61/739,789的优先权,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文中。

### 背景技术

[0003] 生物安全性在现代社会中至关重要。对于食物产品的开发商和分销商而言,对食物或其他材料中的生物污染的测试已成为重要的并且通常是强制性的要求。另外生物学测试也用来识别下述样品中的细菌或其他因子:诸如取自内科病人的血样之类的实验室样品、开发用于实验目的的实验室样品、以及其他类型的生物样品。可利用各种技术和设备来改善生物学测试并且使所述生物学测试过程合理化和标准化。

[0004] 已经开发出广泛多样的培养装置。作为一个例子,培养装置已由明尼苏达州圣保罗(St. Paul, Minnesota)的3M公司(下文“3M”)开发。具体地,培养装置由3M以商品名PETRIFILM板出售。培养装置可用于促进通常与食物污染相关联的微生物的快速生长和检测,所述微生物包括例如好氧菌、大肠杆菌(E. coli)、大肠菌群、肠杆菌、酵母、霉菌、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、李斯特氏菌属(Listeria)、弯曲杆菌属(Campylobacter)等等。PETRIFILM板或其他生长培养基的使用可简化食物样品的细菌测试。

[0005] 培养装置可用于计数或识别细菌的存在,从而使得可执行纠正措施(在食物测试的情况下)或可作出适当诊断(在医学用途的情况下)。在其他应用中,培养装置可用于使实验室样品中的微生物快速生长,例如用于实验目的。

[0006] 生物扫描单元指用于扫描和/或计数微生物菌落的装置。例如,可将食物样品或实验室样品置于培养装置上,然后可将该板插入温育室中。在温育后,可将培养装置置于生物扫描单元中以用于细菌生长的自动化检测和计数。以这种方式,生物扫描单元使培养装置中的微生物菌落的检测和计数自动化,由此通过降低人为错误来改善生物测试过程。

### 发明内容

[0007] 一般来讲,本公开涉及用于辨别扫描图像中的物体的技术。特别地,该技术用于识别培养装置的图像中存在的产气微生物菌落,该培养装置包括在两个基材之间无顶空设置的培养基。另外,该技术还可用于计数培养装置的扫描图像中的产气微生物菌落的数目。为了计数菌落,将含有培养基的培养装置插入扫描单元中。在培养装置插入后,扫描单元生成培养装置的图像。随后,使用在扫描单元内或通过外部计算装置例如台式计算机、工作站等等执行的图像处理和分析例行程序,可计数或以其他方式测定产气微生物菌落的数目。根据本发明,描述了辨别产气菌落的方法。该方法可用于使准确度改善超过扫描图像中的微生物菌落的自动化计数的现有方法。

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种方法。该方法可包括使用成像装置来产生薄膜培养装置的第一图像,该培养装置包括具有透明膜覆盖片的前侧和具有半透明基材的背侧。

第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的。培养装置包括由微生物转化为能够通过第一颜色观察的第一产物的指示剂化合物。培养装置包括可由第一类微生物转化为气体的营养物质。该方法还可包括使用成像装置来产生薄膜培养装置的第二图像,其中所述第二图像是在对装置的背侧提供照明时产生的;分析第一图像以识别在培养装置中的第一位置处的微生物菌落;分析第二图像以识别在培养装置中的第二位置处的第一气泡;以及确定第一位置是否在距第二位置的预定距离内。

[0009] 在任何实施例中,第一图像可为在以前侧照明与背侧照明的第一比率照射该装置时产生的,其中第二图像可为在以前侧照明与背侧照明的第二比率照射该装置时产生的,所述第二比率低于所述第一比率。在上述实施例的任一个中,第一气泡可包括第一周边,其中分析第二图像以识别气泡可包括识别与第一周边相关联的暗环带。在上述实施例的任一个中,分析第二图像以识别第一气泡可包括计算第一气泡的尺寸参数。在上述实施例的任一个中,该方法还可包括比较第一气泡的尺寸参数与第二气泡的尺寸参数。在上述实施例的任一个中,该方法还可包括使用第一图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。在上述实施例的任一个中,该方法还可包括使用第一图像和第二图像来计数不将营养物质转化为气体的微生物菌落数目。

[0010] 在另一个方面,本公开提供了包括计算机可读指令的计算机可读介质。计算机可读指令在由处理器执行时可致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的第一图像,所述培养装置具有前侧和与该前侧相背对的背侧。第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的。分析第一图像包括识别在培养装置中的第一位置处的微生物菌落。计算机可读指令在由处理器执行时还可致使处理器分析薄膜培养装置的第二图像,其中所述第二图像是在对装置的背侧提供照明时产生的。分析第二图像包括识别在培养装置中的第二位置处的气泡。计算机可读指令在由处理器执行时还可致使处理器确定第一位置是否在距第二位置的预定距离内。

[0011] 在计算机可读介质的上述实施例的任一个中,分析第二图像以识别气泡的第二位置可包括围绕识别气泡的暗环带。在上述实施例的任一个中,计算机可读介质还可包括指令,所述指令在处理器中执行时可致使该系统使用第一图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。在上述实施例的任一个中,计算机可读介质还可包括指令,所述指令在处理器中执行时可致使该系统使用第一图像和第二图像来计数培养装置中的产气微生物菌落数目。

[0012] 在另外一个方面,本公开提供了一种方法。该方法可包括分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡并将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第一气泡子集分类到第一可疑非生物成因气泡组中,并且该方法还可包括为第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第二气泡子集分类到可疑生物成因气泡组中,并且该方法还可包括为可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0013] 在另外一个方面,本公开提供了计算机可读介质。计算机可读介质包括计算机可读指令,所述计算机可读指令在由处理器执行时可致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡并将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在

任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第一气泡子集分类到第一可疑非生物成因气泡组中,并且计算机可读指令还可致使处理器为第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第二气泡子集分类到可疑生物成因气泡组中,并且计算机可读指令还可致使处理器为可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0014] 在另外一个方面,本公开提供了一种方法。该方法可包括分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目,分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目,并且比较第一气泡数目与第二气泡数目。在任何实施例中,该方法还可包括分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目,并且比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。在任何实施例中,该方法还可包括分析图像,以检测培养装置的生长区域中的气泡且将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在一些实施例中,该方法还可包括确定是否将在第一区域、第二区域或第三区域中的任一区域中的气泡分配至第一组或第二组。

[0015] 在另外一个方面,本公开提供了计算机可读介质。计算机可读介质包括计算机可读指令,所述计算机可读指令在由处理器执行时可致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目,分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目,并且比较第一气泡数目与第二气泡数目。在任何实施例中,计算机可读指令还可致使处理器分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目,并且比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。在任何实施例中,计算机可读指令还可致使处理器分析图像,以检测培养装置的生长区域中的气泡且将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在任何实施例中,计算机可读指令还可致使处理器确定是否将在第一区域、第二区域或第三区域中的任一区域中的气泡分配至第一组或第二组。

[0016] 本发明的多个方面可提供许多优点。例如,本发明可改善培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。特别地,本文描述的计数规则可解决通常发生且可以其他方式破坏培养装置中的微生物菌落的自动化计数准确度的问题。

[0017] 下面将结合附图和具体实施方式介绍这些及其它实施例的更多细节。通过具体实施方式、附图和权利要求书,其它特征、对象和优点将变得明显。

## 附图说明

[0018] 图1是示例性系统的透视图,所述示例性系统包括联接至外部计算机的扫描装置,所述外部计算机执行由扫描装置生成的图像的成像分析。

[0019] 图2是可对应于图1中所示的系统的生物扫描系统的框图。

[0020] 图3是示出微生物培养装置的自动化分析过程的流程图。

[0021] 图4是根据本公开分析微生物培养装置的方法的一个实施例的框图。

[0022] 图5是根据本公开辨别产气微生物菌落的计数规则的流程图。

[0023] 图6是薄膜培养装置的一部分的黑白图像,其中所述图像在仅照射培养装置的背

侧时获得。

[0024] 图7是图6的薄膜培养装置的一部分的黑白图像,其中所述图像在仅照射培养装置的前侧时获得。

[0025] 图8是图6的行扫描中的像素各自的红色、绿色和蓝色分量相对强度的图。

[0026] 图9是图7的行扫描中的像素各自的红色、绿色和蓝色分量的相对强度的图。

[0027] 图10A是薄膜培养装置的一部分的黑白图像,示出了产气和非产气微生物菌落,其中所述图像在仅照射培养装置的背侧时获得。

[0028] 图10B是图10A的黑白图像,示出图像的第一屏蔽区域。

[0029] 图10C是图10A的黑白图像,示出图像的第二屏蔽区域。

[0030] 图10D是图10A的黑白图像,示出图像的第三屏蔽区域。

### 具体实施方式

[0031] 微生物的检测和计数是许多不同领域中的普遍问题。微生物存在于几乎所有食物、水、空气中以及人与之接触的众多表面和物质上。此类微生物通常是有害的且因此必须进行测量和控制。

[0032] 广泛使用的用于检测物质(例如食物、水、环境残余)中的微生物存在的实践是将适当制备的待测试物质的样品置于培养装置中,并且允许微生物生长成菌落。当在此类培养基中培养时,菌落变得肉眼可见并且可进行计数。每个可见菌落对应于一种初始微生物。本公开的方法使用用于生长且计数微生物菌落的此类培养装置执行。培养装置包括在基质(例如胶凝剂,诸如琼脂、瓜尔胶或果胶)中分布的水性营养培养基,以维持各个菌落的分离。许多培养装置还包括如本文讨论的指示剂化合物。根据本公开的用于生长且检测产气微生物菌落的合适培养装置包括具有设置在两个基材之间的培养基的培养装置。即,培养基是置于两个基材之间的,在培养基和两个基材中的任一者之间无顶空。

[0033] 用于本公开的方法中的合适培养装置包括例如由3M公司以商品名PETRIFILM出售的薄膜培养装置。PETRIFILM薄膜培养装置公开于众多出版物中包括例如美国专利5,364,766;5,601,998;和5,681,712中;所述专利均全文以引用方式并入本文中。

[0034] 许多培养基包括典型琼脂培养基和PETRIFILM板中使用的培养基,包括指示剂化合物以指示微生物的存在。指示剂化合物包括例如pH指示剂、显色酶底物和氧化还原指示剂。当直接或间接转化为产物时,指示剂化合物通常对微生物菌落和/或菌落周围的培养基赋予颜色变化。颜色变化通常使得更容易检测培养基中的微生物菌落的存在(例如,其改善菌落和培养基之间的颜色对比度),并且颜色变化还可用于将与特定指示剂化合物反应的特定菌落和不与指示剂化合物反应的另一微生物菌落相区分。

[0035] 用于生长且区分微生物的许多类型的培养基包括两种或更多种指示剂化合物。例如,当由水性缓冲液和/或样品水合时,PETRIFILM大肠杆菌计数板中的培养基包含氧化还原指示剂(氯化三苯基四唑,下文“TTC”)和显色酶底物(5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-葡糖苷酸,下文“X-gluc”)。TTC与微生物细胞反应以形成略带红色的甲口,其将在革兰氏阴性选择性生长培养基中生长的任何细菌菌落的细胞群染色。相比之下,X-gluc仅与如下细菌反应,除能够在选择性生长培养基中生长之外,该细菌还具有β-D-葡糖苷酸酶活性(例如具有β-D-葡糖苷酸酶活性的大肠杆菌菌株)。X-gluc的水解致使靛青染料形成,该靛青染料将菌落

的细胞群染成蓝色,并且在具有 $\beta$ -D-葡糖苷酸酶活性的菌落周围形成较不强烈的蓝色晕圈。

[0036] 预期本公开的方法可基于其与多种指示剂化合物中的一种或多种的反应以及通过其各自的产气或不产气来用于辨别微生物菌落。微生物菌落可与一种或多种指示剂化合物反应,以产生指示微生物存在的有色或荧光产物。另外,与微生物菌落相关联的气泡的存在指示菌落属于能够将培养装置中存在的营养物质代谢为气态最终产物(例如二氧化碳)的一组微生物。

[0037] 因此,在根据本公开的方法中使用的培养装置包括有效量的营养物质,该营养物质可被转化(例如通过发酵)为气态最终产物(例如二氧化碳)。培养装置还具有独特结构(即置于两个基本上平面的层之间的水合凝胶),使得由微生物活性产生的气泡截留在培养装置中,基本上置换水合凝胶的一部分,由此形成位于平面层之间的可光学检测的空隙空间。在任何实施例中,营养物质可为碳水化合物诸如葡萄糖、蔗糖、乳糖或者前述碳水化合物中的任何两种或更多种的组合。本领域普通技术人员将认识到多种营养物质,其由微生物活性转化为气态最终产物,并且可用于培养基中以识别根据本公开的产气菌落。

[0038] 可选择在本公开的方法中使用的培养基,使得其有利于一种类型的微生物的生长超过其他种类型的微生物。例如,培养基可包括抑制某些微生物(例如革兰氏阴性菌)生长和/或有利于其他微生物生长的选择性成分(例如抗生素、氯化钠、胆汁盐、染料诸如结晶紫)。本领域的普通技术人员将认识到多种选择性试剂,其可用于促进某些微生物在根据本公开的方法使用的培养装置中的生长。

[0039] 根据本公开的方法,根据本领域众所周知的程序将样品制备,接种到培养装置中并温育。样品制备可任选包括稀释、酶促消化、过滤和/或沉降,以在将样品引入培养装置中的营养培养基之内(例如倾倒入铺平板)或之上(例如表面铺平板)之前,从样品中降低或去除非微生物碎片。

[0040] 在适合于怀疑存在于样品中的微生物生长的温度下的足够温育期后,使用成像系统捕获培养装置中的微生物菌落的图像并应用各种图像分析方案,可检测且计数微生物菌落。用于计数和/或区分培养装置中的微生物菌落的成像系统的实例可在国际公开W0 98/59314;以及美国专利7,298,885;8,094,916;和7,496,225中找到;所述专利全文以引用方式并入本文中。检测和/或计数培养装置中的微生物菌落的图像分析方案的实例可见于美国专利6,058,209和6,243,486,所述专利全文以引用方式并入本文中。

[0041] 本公开涉及用于计数培养装置(例如薄膜培养装置)的图像中的微生物菌落的技术。该技术可用于改善对培养装置中的微生物菌落进行自动化计数的准确度。本文公开的计数规则可单独使用,或可与其他计数规则组合使用,例如国际专利公开W0 2005/062744和美国临时专利申请61/739,786(提交于2012年12月20日,并且名称为“METHOD OF DIFFERENTIATING MICROBIAL COLONIES IN AN IMAGE”(区分图像中的微生物菌落的方法))中公开的计数规则,所述专利均全文以引用方式并入本文中。

[0042] 本文公开的计数规则通常作为计算机可执行的软件指令存储,并且由生物扫描系统或图像分析系统(例如处理器和图像分析软件,任选联接至扫描装置)中的处理器执行。另选地,该规则可在硬件诸如专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)或本领域已知的各种硬件部件中实现。取决于被扫描的生长培养基,本文描述的规则可单独应用,或通

过与其他计数规则的任何组合应用。在任何情况下,通过应用本文描述的规则,可改善培养装置(例如薄膜培养装置)上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0043] 在任何实施例中,本公开的方法采用用于检测和计数培养装置中的微生物菌落的系统。用于检测和计数培养装置中的微生物菌落的系统例如在国际专利公开WO 96/18720、WO 96/18167、WO 2005/062744中描述,所述专利均全文以引用方式并入本文中。

[0044] 图1示出了用于检测和计数培养装置中的微生物菌落的系统20的一个实施例的透视图。系统20包括联接至外部计算机22的扫描仪21,所述外部计算机对由扫描仪生成的图像执行成像分析。外部计算机22可包括例如被编程以用于培养装置24的图像分析的微处理器。外部计算机22可包括个人计算机(PC)、台式计算机、膝上型计算机、手持式计算机、工作站、平板个人计算装置、移动装置等等。例如,软件程序可加载到外部计算机22上,以促进对由扫描仪21生成的培养装置24的图像的图像分析。

[0045] 扫描仪21经由接口25联接至外部计算机22。接口25例如可包括通用串行总线(USB)接口、通用串行总线2(USB2)接口、IEEE 1394火线接口、小型计算机系统接口(SCSI)、高级技术附件(ATA)接口、串行ATA接口、外设组件互连(PCI)接口、常规串行或并行接口、无线连接等等。

[0046] 培养装置24任选可包括用于识别培养装置24的标记29,例如条形码或其他类型的识别标记。还可使用RFID标签、二维可光学检测码等等作为标记。在任何情况下,标记29可识别在培养装置24上生长且测试的微生物类型。扫描仪21可设计为将培养装置24拉动到扫描仪21内的第一位置并生成标记29的图像,并且随后将培养装置24拉动到第二位置并生成生长区域27的图像。以这种方式,可通过系统20来生成培养装置的标记29和生长区域27的图像。另选地,单个图像可捕获标记29和生长区域27两者。在任一种情况下,标记29的扫描可有利于识别被使用的板的类型,使得一种或多种期望计数规则可以自动化的形式应用。

[0047] 例如,培养装置24可包括由3M以商品名PETRIFILM板出售的薄膜培养装置。培养装置24可用于促进通常与由于产气微生物的食物污染相关联的微生物的快速生长和检测,所述产气微生物包括例如大肠杆菌、大肠菌群细菌、肠杆菌、沙门氏菌属(*Salmonellae*)等等。培养装置一般包括通常用于生物生长以及细菌检测和计数的一类生长培养基。然而,本发明还可与如本文讨论的其他类型的生长培养基一起应用。

[0048] 在任何实施例中,薄膜培养装置可具有包括透明膜覆盖片的前侧和包括半透明基材的背侧,例如PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板、PETRIFILM大肠菌群计数板和PETRIFILM肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)计数板。不受理论的约束,认为设置在半透明膜和透明膜之间的相对薄(例如大约1-2mm厚)的培养基的组合提供了对于根据本公开辨别产气菌落有益的光学条件。

[0049] 为了改善对培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度,本公开的方法的多个方面建立了可在图像处理期间应用的规则。换句话讲,下文更详细地描述的规则可构成在系统20或图像分析系统(未示出)中执行的菌落计数算法的一部分,所述系统或图像分析系统不直接接收来自成像装置的图像。取决于被扫描的生长培养基类型和可能遇到的问题,该规则可单独使用,或通过与其他图像分析规则(国际专利公开WO 2005/062744中所述的计数规则)的任何组合来使用。通过改善对生长培养基例如薄膜培养装置等等上的微生物菌落的自动化计数的准确度,应用一种或多种计数规则可改善生物扫描系统诸如系统

20。

[0050] 图2是可对应于系统20(图1)的生物扫描系统30的框图。系统30包括成像装置32,其生成生长培养基的一个或多个图像并将所述图像提供至处理器34。处理器34联接至存储器36。存储器36存储多个处理器可执行软件指令,其有利于对由成像装置32生成的图像进行图像分析。特别地,存储器36存储一种或多种计数规则37,其在图像分析期间应用,以改善对培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。输出装置38接收由处理器34确定的结果并且将结果提供给用户。

[0051] 例如,成像装置32可包括2维单色照相机,其用于生成培养装置的一个或多个图像。多种照明器(未示出)可用于照射培养装置的前部和背部。例如,照明器可用一种或多种颜色照射培养装置,并且培养装置的一个或多个图像可由成像装置32生成。另外,对于培养装置的每个图像,控制器(未示出)可控制前侧照明与背侧照明的比率。可用于使薄膜培养装置成像的成像装置的非限制性实例在美国专利8,094,916(其全文以引用方式并入本文中)中有所描述,所述成像装置提供前侧和背侧照明,任选使用多种照明颜色。

[0052] 根据本公开分析图像的方法涉及使用培养装置的至少一个图像。任选地,该方法可使用两个图像;每个图像使用照射培养装置的不同条件获得,以更准确地辨别产气微生物菌落。第一图像可在照射培养装置的“前侧”(即培养装置面对成像装置的侧面)时获得。薄膜培养装置的前侧是具有透明覆盖片的侧面。第二图像可在照射培养装置的“背侧”时获得。薄膜培养装置的背侧是与覆盖片相背对的侧面。在被构造成检测产气微生物菌落的许多PETRIFILM板(例如PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板、PETRIFILM大肠菌群计数板、PETRIFILM快速大肠菌群计数板和PETRIFILM肠杆菌科(Enterobacteriaceae)计数板)中,薄膜培养装置的背侧包括半透明聚合物膜。

[0053] 照射培养装置的“前侧”可包括使培养装置暴露于来自照射装置前侧的照明器的照明。在一个实施例中,使用来自照射培养装置前侧的照明器的100%照明和来自照射培养装置背侧的照明器的0%照明,可获得第一图像。在另一个实施例中,例如,使用来自照射培养装置前侧的照明器的80%照明和来自照射培养装置背侧的照明器的20%照明,可获得第一图像。前侧照明与背侧照明的比率可选择成为培养装置中的特定类型的营养培养基提供最佳对比度。

[0054] 在该方法的任何实施例中,第一图像是在用前侧照明与背侧照明的第一比率(例如100%:0%)照射该装置时产生的,并且第二图像是在用前侧照明与背侧照明的第二比率(例如0%:100%)照射该装置时产生的,所述第二比率低于所述第一比率。在任何实施例中,第一比率可大于1:1。在任何实施例中,第二比率可小于1:1。

[0055] 应当指出的是,如本文所用,“第一图像”指在培养装置接收主要来自板前侧的照明时获得的图像,并且如本文所用,“第二图像”指在培养装置接收主要来自板背侧的照明时获得的图像。术语“第一图像”和“第二图像”的使用不预期暗示获得图像的时间次序。相应地,培养装置的第一图像可在培养装置的第二图像之前或之后获得。另外,图像之一(例如分别的第一图像或第二图像)无需通过在获得另一图像(例如分别的第二图像或第一图像)之后立即使培养装置成像来获得。推荐第一图像和第二图像在时间上足够紧密地获得,以避免在图像采集之间的间隔时间期间发生显著生物学变化(例如生长或酶活性)或物理变化(例如脱水)的可能性。因此,在优选实施例中,第一图像在获得第二图像时约30秒内获

得。

[0056] 本领域普通技术人员将认识到,在其中成像装置被定位成面对培养装置的前侧并且照明器也被定位成使得照明指向培养装置的前侧的系统中,由成像装置产生的图像基本上包括由培养装置及其内容物反射的光。另外,本领域普通技术人员还将认识到,在其中成像装置被定位成面对培养装置的前侧并且照明器也被定位成使得照明指向培养装置的背侧的系统中,由成像装置产生的图像基本上包括由培养装置及其内容物透射和/或折射的光。

[0057] 照射培养装置的“背侧”可包括使培养装置暴露于来自照射装置背侧的照明器的照明。在一个实施例中,使用来自照射培养装置背侧的照明器的100%照明和来自照射培养装置前侧的照明器的0%照明,可获得第二图像。在另一个实施例中,例如,使用来自照射培养装置背侧的照明器的80%照明和来自照射培养装置前侧的照明器的20%照明,可获得第二图像。前侧照明与背侧照明的比率可选择成为培养装置中的特定类型的营养培养基提供最佳对比度。

[0058] 在本公开的方法的任何实施例中,可能期望仅使用由背侧照明获得的图像或由前侧照明获得的图像。如图6和图7所示以及下文讨论的,背侧照明可提供在薄膜培养装置中的培养基和气泡(例如气泡的周边)之间的特别增强的对比度。

[0059] 图像被提供给处理器34并且还可存储于存储器36中。在任何情况下,图像通过应用计数规则37进行分析,以便测定培养装置上的细菌计数。成像装置32的分辨率可为大约155个像素/厘米。在所述情况下,图像中的一厘米线长155个像素。

[0060] 处理器34可包括执行存储器36中存储的软件的通用微处理器。另选地,处理器34可包括专用集成电路(ASIC)或其他专门设计的处理器。在任何情况下,处理器34执行多种计数规则37,以改善对培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0061] 存储器36是计算机可读介质的一个实例,其存储由处理器34应用的处理器可执行的软件指令。例如,存储器36可包括随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、非易失性随机存取存储器(NVRAM)、电可擦可编程只读存储器(EEPROM)、闪存存储器等等。计数规则37诸如下文描述的那些存储于存储器36中,并且可构成用于图像分析的更大型软件程序的一部分。

[0062] 输出装置38通常包括用于将结果传达给用户的显示屏。然而,输出装置38还可包括其他类型的装置诸如打印机等等。输出装置38可构成扫描单元的一部分,诸如显示器(未示出),或可对于扫描单元是外部的,诸如外部计算机22的显示屏(图1)。

[0063] 图3是示出自动化培养装置分析的过程的流程图。如图3所示,处理器34接收培养装置的一个或多个图像(步骤41)。处理器34调用来自存储器36的多种软件例行程序,以识别培养装置上的微生物菌落(步骤42)。例如,细菌菌落可根据在与营养培养基中的一种或多种指示剂化合物反应(即直接地或间接地)后,它们产生的特有颜色进行识别。菌落识别的其他方面在本文中讨论。由处理器34执行的软件可允许基于菌落已在温育期间在其中生长的生长区域中的颜色变化来识别在培养装置上的生长区域并对细菌菌落进行自动化计数。任选地,处理器可调用例行程序,以计数所识别的微生物菌落。产气菌落可分离到对在培养装置中不产生气体的菌落的计数分开的计数中。

[0064] 根据本公开的方法,处理器34应用一种或多种规则,以改善对生长培养基上的微

生物菌落的计数的准确度(步骤43)。取决于被分析的培养装置类型,规则可单独应用,或可使用规则的多种组合。规则可单独地由存储器36调用,或可构成更大型的图像分析软件程序的子例行程序。规则可单独应用,或可应用规则的多种集合。如果使用规则集合,则可基于被扫描以获得一个或多个图像的板的类型来选择应用规则的次序。对于规则应用所选择的次序可影响最终结果。多种规则子集也可以任何次序应用,并且对于规则子集所选择的次序也可影响最终结果。

[0065] 图4示出了根据本公开的方法100的一个实施例。该方法包括在照射培养装置的前侧时获得第一图像的步骤51,以及在照射培养装置的背侧时获得第二图像的步骤52。培养装置的前侧和背侧可用如本文公开的成像系统进行照射。方法100还包括分析第一图像以识别培养装置中的微生物菌落位置的步骤53。方法100还包括分析第二图像以识别培养装置中的气泡位置的步骤54。

[0066] 分析第二图像以识别气泡的位置可包括将气泡识别为可与培养装置中的培养基辨别的物体(图像中)。将气泡识别为可与培养基辨别的物体可通过应用由Weiss(美国专利6,381,353)公开的图像分析技术来完成。分析图像可包括RGB(红色/绿色/蓝色)图像处理算法。另选地或另外地,分析图像可包括HSI(色调、饱和度和强度)、HSL(色调、饱和度和亮度)、HSV(色调、饱和度和值)算法或它们组合。因为由产气菌落产生的气泡通常置换设置在薄膜培养装置的覆盖片和基材之间的培养基的一些或全部,所以气泡可作为图像中具有比周围培养基和/或微生物菌落基本上更少的颜色的区域。然而,薄膜培养装置的独特构型允许检测图像中的气泡存在的另选方法-检测围绕气泡的相对暗的环带。

[0067] 不受理论的约束,接触培养基的气泡边缘可用作透镜以允许光在整个气泡上的透射。另外,边缘可用作镜子以反射透射光的图像。因此,因为培养基和菌落通常是有色的,并且颜色通常暗于构成薄膜培养装置的背部的基材,所以培养基和/或菌落的透射(和反射)图像构成围绕相对浅色的气泡中心部分的相对深色的环带。该暗环带可作为鲜明的颜色和/或亮度变化检测到,其可容易地从培养基和通常暗于培养基的微生物菌落辨别,如图6所示和实例1中所述。

[0068] 第一图像和第二图像如此获得,以便以至少一种颜色的阴影来限定图像中的物体。因此,分析第一图像和/或第二图像以识别每个图像中的微生物菌落可包括根据本领域众所周知的图像分析方法将图像中的物体识别为菌落。例如,Weiss描述了基于一个或多个标准包括物体尺寸、可见度、颜色、表面质量和形状来识别图像中的物体(例如微生物菌落)的技术(美国专利6,243,486,其全文以引用方式并入本文中)。如上所述,检测与包括TTC的指示剂化合物反应的微生物菌落的方法可被构造成检测颜色为红色的阴影,并且检测与包括5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\beta$ -D-葡糖苷酸的指示剂化合物反应的微生物菌落的方法可构造成检测颜色为蓝色的阴影。

[0069] 分析第一图像和/或第二图像以识别图像中的微生物菌落包括识别图像中检测到的任何菌落的位置。培养装置中的菌落位置用于比较培养装置中的菌落位置与气泡位置。菌落或气泡的位置可通过图像中的X-Y坐标进行识别。因此,在一个优选实施例中,第一图像和第二图像两者均在获得第一图像之后但在获得第二图像之前不移动或以其他方式处理培养装置的情况下而获得。另选地,对准界标(例如PETRIFILM板的两个或更多个拐角或者在任何培养装置上制备的对准界标)可用于适当定向图像,以便测定并比较第一图像和

第二图像中的物体(例如菌落、气泡)位置。

[0070] 在分析第一图像和第二图像以识别培养装置中的微生物菌落和气泡的位置后,方法100还包括比较微生物菌落和气泡的位置的步骤55。比较位置可包括计算特定微生物菌落和接近该菌落的一个或多个气泡之间的距离(例如以像素表示)。该距离可用于确定气泡是否与特定菌落相关联,并且由此推断该特定菌落是否是产气微生物菌落。

[0071] 由制造商提供的与PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板一起使用的解读指南提供了关于确定气泡是否与特定菌落相关联的指导。部分地,该指导涉及气泡与微生物菌落的接近。一般来讲,接触特定微生物菌落的气泡视为与该菌落相关联(即由其产生)。另外,定位在等于约三个菌落直径的距离内的气泡视为与该菌落相关联(即由其产生)。因此,根据本公开分析图像(例如本文公开的第一图像或第二图像)以识别产气微生物的存在或位置包括分析图像以识别一个或多个气泡的存在或位置。气泡相对于任何接近微生物菌落的位置用于确定气泡是否由构成该菌落的微生物产生。

[0072] 分析图像(例如本文公开的第一图像或第二图像)以识别一个或多个气泡的存在或位置还可包括分析图像以确定图像中的一个或多个气泡的尺寸参数(例如半径、直径和/或面积)。例如,尺寸参数可通过计算气泡的半径、直径或面积中的像素数目来确定。当在图像中观察到多个气泡时,关于多个气泡中的每个气泡的尺寸参数可例如在柱状图中进行比较。柱状图可示出图像中发现的气泡的尺寸(例如半径、直径或面积)分布。另外,柱状图可示出气泡的尺寸分布中的间隙。这些间隙可用于区分非生物成因气泡与生物成因气泡。

[0073] 全文以引用方式并入本文中的国际专利公开WO2012/012104描述了在薄膜培养装置中可观察到的小型非生物成因气泡的存在。该专利申请还公开了随着微生物菌落发展,在微生物菌落周围的区域内的非生物成因气泡的缩小或消失。非生物成因气泡和微生物菌落周围的区域(即缺乏非生物成因气泡的区域)在下文描述的图6中明确可见。因此,本公开的方法的任何实施例还可包括计算菌落周围的区域中的气泡数目。例如,菌落周围的区域面积可小于或等于菌落面积约五倍。该方法任选可包括将在接近微生物菌落的区域内可观察的气泡数目与培养装置中的营养培养基的另一区域(例如“对照”区域)中可观察的气泡数目进行比较,所述另一区域不含菌落。当作出该比较时,如果接近微生物菌落的区域内可观察的气泡数目基本上低于对照区域中可观察的气泡数目,则接近微生物菌落的第一气泡的存在可指示微生物菌落是产气微生物菌落,而与第一气泡的尺寸无关。

[0074] 在任何实施例中,本公开的方法还可包括比较第一气泡的尺寸参数与第二气泡的尺寸参数。当多个气泡存在于图像中时,比较第一气泡的尺寸参数与第二气泡的尺寸参数可包括对于多个气泡中的每个气泡产生尺寸参数值的柱状图。尺寸参数值(例如半径、直径或面积)的分布可揭示具有类似尺寸的气泡的簇。簇可分成一个或多个组。

[0075] 柱状图可用于确定阈值尺寸参数值(例如关于气泡半径、直径或面积)或尺寸参数范围,其用于辨别由产气微生物产生的第一气泡与不由产气微生物产生的第二气泡。有利地,比较在培养装置中观察到的多个气泡的尺寸可用于辨别趋于具有相对一致尺寸的非生物成因气泡与通常大于非生物成因气泡的由微生物菌落产生的气泡。

[0076] 由制造商提供的与PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板一起使用的解读指南提供了关于确定气泡是否与特定菌落相关联的另外指导。一般来讲,当气泡接近特定微生物菌落且气泡具有的直径约等于或大于接近菌落的直径时,气泡视为与该菌落相关联(即由

其产生)。然而,本领域普通技术人员将认识到可存在这样的情况(例如当样品和/或培养装置包括抑制微生物产气的营养物质时),其中与产气菌落相关联的气泡可具有小于它与之相关联的产气微生物菌落的尺寸参数值(例如直径)。

[0077] 图5是示出根据本公开将菌落区分为多个菌落类型的规则的流程图。如图2所示,处理器34调用存储于存储器36中的软件,以识别第一图像和第二图像中的菌落和气泡的位置且将所述位置作图(步骤61)。特别地,处理器34确定使用第一图像识别且定位的菌落是否对应接近使用第二图像识别且定位的气泡的位置(步骤62)。如果在分析第一图像和第二图像时发现接近气泡的菌落,则处理器34应用接近系数以确定气泡是否与该接近菌落相关联(即由其产生)。如果如上所述,气泡在菌落的预定距离内(例如在相当于约三个菌落直径内),则培养装置中的菌落计数为第一类型(例如“产气”;参见图5,步骤63)。如果如上所述,气泡不在菌落的预定距离内(例如比相当于约三个菌落直径更远),则培养装置中的菌落计数为第二类型(例如“非产气”;参见图5,步骤64)。

[0078] 任选地,附加步骤(未示出)可加入图5中示出的计数规则中。附加步骤可在步骤61后以及步骤63或步骤64前的任何点插入步骤顺序中。第一附加步骤涉及对图像中具有气泡尺寸(例如直径或面积)的每个气泡的位置作图。第二附加步骤比较气泡的尺寸与预定尺寸值(或预定尺寸值范围),以确定特定气泡的尺寸是小于、大于还是等于预定尺寸值,或者确定特定气泡的尺寸是否在预定范围内。因此,包括附加步骤的计数规则利用与每个气泡相关联的两个参数(即,气泡的尺寸和气泡与菌落的接近),以作出气泡是否与微生物活性相关联的确定(即确定微生物菌落是否应计数为产气微生物菌落)。

[0079] 在该方法的一些实施例中,将微生物菌落识别为产气微生物菌落可允许操作者识别菌落中的微生物属于其的特定分类或组。例如,如果培养基包含有利于革兰氏阴性肠细菌生长的营养物质和选择性试剂,并且培养基中的可发酵营养物质是乳糖,则微生物可推定识别为属于称为大肠菌群细菌的一组细菌。在另一个实例中,如果培养基包括有利于革兰氏阴性肠细菌生长的营养物质和选择性试剂,并且培养基中的可发酵营养物质是葡萄糖,则微生物可推定识别为属于称为肠杆菌科的细菌科。

[0080] 图6是薄膜培养装置的生长区域的一部分的黑白图像。如实例1中所述,该图像在仅照射培养装置的背侧时获得。在生长区域内的是多个微生物菌落(71-73)。图6中还显示的是多个气泡(81-84)。可观察到气泡81-83具有的面积大于接近(即在小于或等于约三个菌落直径的距离内)气泡的至少一个微生物菌落(例如菌落71)。因此,根据本公开的方法,所有三个气泡(气泡81-83)均视为“生物成因”气泡(即它们由样品中的微生物产生)。相比之下,存在分布遍及培养装置的生长区域中的培养基的众多极小的气泡84。因为这些气泡(即气泡84)在它接种后不久(即在微生物菌落在培养装置中出现前数小时)在培养装置中显而易见,且因为气泡的面积(体积)在延长温育后不增加(例如,一般地,它们保持基本上小于典型微生物菌落直径),所以它们视为“非生物成因”气泡(即它们不是由样品中的微生物产生的),如上所述。图6中还显示的是对培养装置的生长区域的一部分的行扫描路径90。路径90横贯包括气泡82的图像的一部分。

[0081] 当分析图6所示的图像的更大部分以确定气泡的面积时,观察到对于该图像,大约九十个非生物成因气泡(即气泡84)的平均面积小于或等于50个像素(即约50个像素的面积代表相对小的非生物成因气泡的尺寸上限)。相比之下,图6的二维图像中的生物成因(即与

微生物活性相关联) 气泡81-83各自的单独面积分别为大约625个像素、1125个像素和875个像素。因此,非生物成因气泡(即具有小于或等于约50个像素的那些气泡)的相对紧密簇和生物成因气泡(即具有大于或等于约500个像素的那些气泡)的相对松散簇之间的尺寸差距可用于设定下阈值(例如约75个像素、约100个像素、约200个像素或约250个像素),所述下阈值可用于指定特定图像中的生物成因气泡。在任何实施例中,该阈值可使用动态计算(即基于特定培养装置的特定图像的气泡群体计算)进行设定,所述阈值基于非生物成因气泡组的最大尺寸参数值的设定百分比(例如约125%、约200%、约300%、约400%)。

[0082] 因此,根据本公开的方法,气泡可分类到至少两组中;具有约50个像素或更少的二维面积的第一组和具有大于约50个像素的二维面积的第二组。相应地,分类(例如根据尺寸)成第一组的气泡可识别为可疑非生物成因气泡(即,可能不是微生物相关联的)。相反地,分类(例如根据尺寸)成第二组的气泡可识别为可疑生物成因气泡(即,可能是微生物相关联的)。在该方法的任何实施例中,可为第二组分配尺寸下限。例如,第二组的尺寸下限可为比非生物成因气泡的估计尺寸上限大至少50%、大至少100%或大至少150%的尺寸参数值。根据该方法,包括具有落入第一组的尺寸上限和第二组的尺寸下限之间的尺寸参数值的气泡的任何培养装置可任选进行标记,以用于由技术人员查看。

[0083] 在该方法的一些实施例中,可分配可疑生物成因气泡的尺寸上限(例如通过运行对照培养装置,以建立给定微生物的生物成因气泡的最大尺寸)。在这些实施例中,超过第二组的尺寸上限的气泡将被分类到第三组中。第三组包括相对大的非生物成因气泡,其可在接种期间引入培养装置中,例如其可指示操作者使用问题。当在图像中观察到超过尺寸上限的气泡时,通知信息可发布给操作者。

[0084] 图7示出图6所示的薄膜培养装置的相同部分的黑白图像。如实例1中所述,该图像在仅照射培养装置的前侧时获得。尽管生物成因气泡(即图6的气泡81-83)是可见的,但培养基和生物成因气泡之间的对比度明显更低。另外,气泡的外边缘在图7的图像中不像它在图6的背光图像中那样清晰描绘。图7中还显示的是对图6所示的生长区域的一部分的行扫描路径91。路径91对应于与图6的路径90中的那些相同的像素。

[0085] 为了识别背光图像中的菌落的存在和位置,并且识别前光图像中的微生物菌落的存在和位置,图像分析算法通常逐行分析数字图像中的像素,比较第一像素或第一组像素的颜色色调和/或颜色强度与接近第一像素的第二像素或接近第一组像素的第二组像素的颜色色调和/或颜色强度。这类比较允许算法识别可指示图像中的微生物菌落、气泡或其他物体边缘的颜色和/或强度转变。图8示出沿图6的背光图像中的行90,来自像素的红色、绿色和蓝色的透射颜色强度的图。如由与气泡周边的相对边缘相关联的暗环带所证实的那样,气泡的锐利分界线在图中作为尖锐的负峰(分别为A和B)可见。图9示出沿图7的前光图像中的行91,得自像素的红色、绿色和蓝色的反射像素强度的图。

[0086] 除提供分析图像以识别薄膜培养装置中的气泡的存在和各自尺寸的方法之外,本公开还提供了分析图像以识别薄膜培养装置中的特定气泡(例如“第一”气泡)的二维背景的方法。第一气泡的“二维背景”指在接近第一气泡的预定面积内的其他气泡的存在或不存在。接近气泡的存在和数目可用于确定第一气泡是可疑生物成因气泡(即可能与微生物活性相关联)还是可疑非生物成因气泡(即可能不与微生物活性相关联)。

[0087] 例如,图10A示出图6的图像所示的薄膜培养装置的更大部分的图像。在图10A中,

微生物菌落71、72、73、74和75通过其与培养基中存在的显色指示剂的相互作用是显而易见的。图10A中还显而易见的是非生物成因气泡84以及生物成因气泡81、82、83、85、86和87。在一个方面,如本文描述的,基于其各自的尺寸和/或与微生物菌落的接近,生物成因气泡(81-83和85-87)可识别为生物成因的。在另一个方面,生物成因气泡可基于其二维背景进行识别。图10A示出尽管非生物成因气泡基本上均匀分散在不包括微生物菌落的培养基的区域中(参见图10B),但非生物成因气泡的尺寸基本上更小,或非生物成因气泡基本上不存在于包括一个或多个微生物菌落的培养基的区域(例如图10A的区域101、102和103)中。该观察到的现象可用于识别可疑生物成因气泡,而无需观察接近特定可疑气泡的微生物菌落。

[0088] 用于分析薄膜培养装置的图像中的特定气泡的二维背景的一种技术是将培养装置的生长区域的图像分成多个子区(subdivision),每个子区具有均匀的预定尺寸和形状,并计数每个子区中的气泡数目。这可例如通过图像分析领域已知的屏蔽技术来完成。图10B-10D示出其中指示区域(分别为区域A1、A2和A3)由均匀尺寸和形状的屏蔽或框架封闭的图10A图像。可观察到不涵盖任何微生物菌落的区域A1包括大约三十四个相对小的基本上均匀分布的非生物成因气泡。相比之下,涵盖至少两个微生物菌落的区域A2(图10C)包括总共大约七个在区域A2中并非基本上均匀分布的气泡。另外,涵盖一个微生物菌落的区域A3(图10D)包括总共约二十五个相对小的基本上均匀分布的非生物成因气泡。

[0089] 根据本公开的方法,分析薄膜培养装置的图像可包括分析多个区域,以检测区域中存在的气泡数目。在任何实施例中,区域中的两个或更多个可重叠。在一个实施例中,用于分析每个区域的屏蔽可跨越图像逐行光栅扫描(rastered),以观察邻近区域之间的差异,并且由此识别可能包括微生物菌落的特定目的区域(在图像内)。目的区域(例如图10A的区域101、102和103)可通过相对于图像内的其他区域(例如具有相似尺寸的区域),在目的区域中的较低气泡数目进行识别。

[0090] 根据本公开的方法,分析图像还可包括识别图像的可疑区域(例如上述目的区域中的一个或多个),其中相对于图像的另一部分,可疑区域具有基本上减少的气泡数目。在这些情况下,可疑区域的一部分(例如可疑区域的中心部分)中的气泡存在可指示与微生物活性相关联的生物成因气泡的存在。当检测到这种情况时,在可疑区域中检测到的气泡尺寸可确认可疑区域中的气泡是生物成因气泡。如果可疑区域中的气泡尺寸大于图像的其他区域中检测到的非生物成因气泡,则这强烈指示气泡是生物成因的。与其尺寸无关,接近位于可疑区域(即具有比图像中的其他培养基区域明显更少的气泡的图像区域)中的微生物菌落的气泡可为生物成因气泡,并且培养装置可报告为对于产气微生物阳性。另选地或另外地,图像可进行标记以用于由操作者查看。

[0091] 具有计数规则的扫描系统和/或图像分析系统用于区分薄膜培养装置图像中的气泡和/或微生物菌落的用途已得到描述。计数规则可用于扫描系统中,以改善对培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0092] 分析薄膜培养装置图像的上述技术可用于检测接种到薄膜培养装置中的样品中的微生物的存在或不存在的方法中。在一个方面,该方法包括分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡且将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。如本文描述的,可分析

生长区域的图像以检测气泡。气泡可根据尺寸参数进行分类,并且如本文公开的,可分配关于每组的尺寸上限和/或尺寸下限。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第一气泡子集分类到第一可疑非生物成因气泡组中。在这些实施例中,如本文描述的,该方法还包括对第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第二气泡子集分类成可疑生物成因气泡组中。在这些实施例中,如本文描述的,该方法还包括对可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0093] 在另一个方面,该方法包括分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目,分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目,并且比较第一气泡数目与第二气泡数目。如本文描述的,分析第一区域和第二区域可包括使用图像屏蔽来计数第一区域和第二区域内的气泡数目,其中所述图像屏蔽限定区域的指定大小和形状。在任何实施例中,该方法还可包括分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目,并且比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。第一区域、第二区域和/或第三区域可彼此间隔开,或所述区域中的至少两个可部分重叠。

[0094] 在另外一方面,本文描述的方法中的两种或更多种可合并成单一方法,以检测薄膜培养装置中的微生物的存在或不存在。例如,该方法可包括分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目,分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目,比较第一气泡数目与第二气泡数目,分析图像以检测培养装置的生长区域中的气泡并将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在一些实施例中,该方法还可包括确定在第一区域、第二区域或第三区域中的任一个中的气泡是否分配至第一组或第二组。有利地,在该实施例中,在解释其附近的气泡数目和尺寸的背景分析特定气泡的尺寸,由此使用两个分开标准来确认特定气泡是生物成因还是非生物成因的。

[0095] 该技术已描述为软件实现的。在所述情况下,计算机可读介质存储处理器可执行指令,其体现上文描述的规则中的一种或多种。例如,计算机可读介质可包括非暂态计算机可读介质,诸如随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、非易失性随机存取存储器(NVRAM)、电可擦可编程只读存储器(EEPROM)、闪存存储器等等。计算机可读介质还可包括非易失性存储器诸如用于将软件递送给客户的CD-ROM。另外,计算机可读介质还可包括电磁载波,例如用于经过网络诸如因特网递送软件。

[0096] 然而,相同技术还可在硬件中实现。示例硬件实现包括在专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)、专门设计的硬件部件或它们的任何组合内的实现。另外,本文描述的技术中的一种或多种可部分在硬件、软件或固件中执行。

[0097] 因此,本公开提供了含有计算机可读指令的计算机可读介质,所述计算机可读指令用于检测薄膜培养装置中的微生物存在或不存在。在一个方面,当通过处理器执行时,计算机可读指令致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的第一图像,所述培养装置具有前侧和与该前侧相背对的背侧;其中如本文描述的,所述第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的。分析第一图像包括识别在培养装置中的第一位置处的微生物菌落。当通过处理器执行时,计算机可读指令还致使处理器分析薄膜培养装置的第二图像;其中所述第二图像是在对装置的背侧提供照明时产生的。如本文描述的,分析第二图像包括识别在培养装置中的第二位置处的气泡。当通过处理器执行时,计算机可读指令还致使处理

器确定第一位置是否在距第二位置的预定距离内。

[0098] 在另一个方面,当通过处理器执行时,计算机可读指令致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡并将多个气泡分类。如本文描述的,将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第一气泡子集分类成第一可疑非生物成因气泡组中,其中计算机可读指令还致使处理器对第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。在任何实施例中,将气泡分类到第一组和第二组中可包括将第二气泡子集分类到可疑生物成因气泡组中,其中计算机可读指令还致使处理器对可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0099] 在另一个方面,当通过处理器执行时,计算机可读指令致使包括处理器的图像分析系统分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目,分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目,并且比较第一气泡数目与第二气泡数目。在任何实施例中,计算机可读指令还致使处理器分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目,并且比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。在任何实施例中,如本文描述的,计算机可读指令还致使处理器分析图像,以检测培养装置的生长区域中的气泡并将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。在一些实施例中,计算机可读指令还致使处理器确定在第一区域、第二区域或第三区域中的任一区域中的气泡是否分配至第一组或第二组。

[0100] 在任何实施例中,包括计算机可读指令的计算机可读介质可具有包括本文描述的方法中的两种或更多种的指令。两种或更多种方法可单独或组合使用,以改善产气微生物菌落的检测准确度。

#### [0101] 实施例

[0102] 实施例A为一种方法,该方法包括:

[0103] 使用成像装置来产生薄膜培养装置的第一图像,该培养装置包括具有透明膜覆盖片的前侧和具有半透明基材的背侧;

[0104] 其中所述第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的;

[0105] 其中所述培养装置包括由微生物转化为能够通过第一颜色观察的第一产物的指示剂化合物;

[0106] 其中所述培养装置包括可由第一类微生物转化为气体的营养物质;

[0107] 使用成像装置来产生薄膜培养装置的第二图像,其中所述第二图像是在对装置的背侧提供照明时产生的;

[0108] 分析第一图像以识别在培养装置中的第一位置处的微生物菌落;

[0109] 分析第二图像以识别在培养装置中的第二位置处的第一气泡;以及

[0110] 确定第一位置是否在距第二位置的预定距离内。

[0111] 实施例B是根据实施例A所述的方法,其中所述第一图像是在以前侧照明与背侧照明的第一比率照射该装置时产生的,其中所述第二图像是在以前侧照明与背侧照明的第二比率照射该装置时产生的,所述第二比率低于所述第一比率。

[0112] 实施例C是根据实施例B所述的方法,其中所述第一比率为约100%:0%。

[0113] 实施例D是根据实施例B或实施例C所述的方法,其中所述第二比率为约0%:100%。

[0114] 实施例E是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中所述第一气泡包括第一周边,其中分析第二图像以识别第一气泡包括识别与第一周边相关联的暗环带。

[0115] 实施例F是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中分析第二图像以识别第一气泡包括计算第一气泡的尺寸参数。

[0116] 实施例G是根据实施例F所述的方法,其中所述尺寸参数是半径、直径或面积。

[0117] 实施例H是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中分析第二图像以识别第一气泡包括分析围绕第一气泡的第一预定区域,以检测第二气泡。

[0118] 实施例I是根据实施例H所述的方法,其中所述第一预定区域包括微生物菌落,其中所述方法还包括比较第一预定区域中的气泡数目与第二预定区域中的气泡数目,其中所述第二预定区域不包括微生物菌落。

[0119] 实施例J是根据实施例F至I中任一项所述的方法,该方法还包括比较第一气泡的尺寸参数与第二气泡的尺寸参数。

[0120] 实施例K是根据前述实施例中任一项所述的方法,该方法还包括使用第一图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。

[0121] 实施例L是根据实施例K所述的方法,该方法还包括使用第一图像和第二图像来计数将营养物质转化为气体的微生物菌落数目。

[0122] 实施例M是根据前述实施例中任一项所述的方法,该方法还包括使用第一图像和第二图像来计数不将营养物质转化为气体的微生物菌落数目。

[0123] 实施例N是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中所述指示剂化合物包括四唑鎓染料。

[0124] 实施例O是根据前述实施例中任一项所述的方法,其中所述营养物质包含碳水化合物。

[0125] 实施例P是根据实施例O所述的方法,其中所述碳水化合物选自葡萄糖、蔗糖、乳糖或者前述碳水化合物中的任何两种或更多种的组合。

[0126] 实施例Q是包括计算机可读指令的计算机可读介质,所述计算机可读指令在由处理器执行时致使包括处理器的图像分析系统:

[0127] 分析薄膜培养装置的第一图像,所述培养装置具有前侧和与该前侧相背对的背侧;

[0128] 其中所述第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的;

[0129] 其中分析第一图像包括识别在培养装置中的第一位置处的微生物菌落;

[0130] 分析薄膜培养装置的第二图像;

[0131] 其中所述第二图像是在对装置的背侧提供照明时产生的;

[0132] 其中分析第二图像包括识别在培养装置中的第二位置处的气泡;以及

[0133] 确定第一位置是否在距第二位置的预定距离内。

[0134] 实施例R是根据实施例Q所述的计算机可读介质,其中分析第二图像以识别气泡的第二位置包括识别围绕气泡的暗环带。

[0135] 实施例S是根据实施例Q或实施例R所述的计算机可读介质,所述计算机可读介质

还包括计算机可读指令,所述计算机可读指令在处理器中执行时致使该系统使用第一图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。

[0136] 实施例T是根据实施例Q或实施例R所述的计算机可读介质,所述计算机可读介质还包括计算机可读指令,所述计算机可读指令在处理器中执行时致使该系统使用第一图像和第二图像来计数培养装置中的产气微生物菌落数目。

[0137] 实施例U为一种方法,该方法包括:

[0138] 分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡;以及

[0139] 将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。

[0140] 实施例V是根据实施例T所述的方法,其中将气泡分类到第一组和第二组中包括将第一气泡子集分类到第一可疑非生物成因气泡组中,其中该方法还包括为第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。

[0141] 实施例W是根据实施例U或实施例V所述的方法,其中将气泡分类到第一组和第二组中包括将第二气泡子集分类到可疑生物成因气泡组中,其中该方法还包括为可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0142] 实施例X是根据实施例W所述的方法,其中可疑生物成因气泡组的尺寸参数值下限比第一可疑非生物成因气泡组的尺寸参数值上限大至少约两倍。

[0143] 实施例Y是包括计算机可读指令的计算机可读介质,所述计算机可读指令在由处理器执行时致使包括处理器的图像分析系统:

[0144] 分析薄膜培养装置的生长区域的图像,以检测气泡;以及

[0145] 将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。

[0146] 实施例Z是根据实施例Y所述的计算机可读介质,其中将气泡分类到第一组和第二组中包括将第一气泡子集分类到第一可疑非生物成因气泡组中,其中计算机可读指令还致使处理器为第一可疑非生物成因气泡组分配尺寸参数值上限。

[0147] 实施例AA是根据实施例Y或实施例Z所述的计算机可读介质,其中将气泡分类成第一组和第二组中包括将第二气泡子集分类到可疑生物成因气泡组中,其中计算机可读指令还致使处理器为可疑生物成因气泡组分配尺寸参数值下限。

[0148] 实施例BB为一种方法,该方法包括:

[0149] 分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目;

[0150] 分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目;以及

[0151] 比较第一气泡数目与第二气泡数目。

[0152] 实施例CC是根据实施例BB所述的方法,该方法还包括:

[0153] 分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目;以及

[0154] 比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。

[0155] 实施例DD是根据实施例BB或实施例CC所述的方法,该方法包括:

[0156] 分析图像,以检测培养装置的生长区域中的气泡;以及

[0157] 将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联

的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。

[0158] 实施例EE是根据实施例DD所述的方法,该方法包括:

[0159] 确定在第一区域、第二区域或第三区域中的任一区域中的气泡是否分配至第一组或第二组。

[0160] 实施例FF是包括计算机可读指令的计算机可读介质,所述计算机可读指令在由处理器执行时致使包括处理器的图像分析系统:

[0161] 分析薄膜培养装置的生长区域的图像的第一区域,以检测第一区域中的第一气泡数目;

[0162] 分析图像的第二区域,以检测第二区域中的第二气泡数目;以及

[0163] 比较第一气泡数目与第二气泡数目。

[0164] 实施例GG是根据实施例FF所述的计算机可读介质,其中所述计算机可读指令还致使处理器:

[0165] 分析图像的第三区域,以检测第三区域中的第三气泡数目;以及

[0166] 比较第一气泡数目或第二气泡数目与第三气泡数目。

[0167] 实施例HH是根据实施例FF或实施例GG所述的计算机可读介质,其中所述计算机可读指令还致使处理器:

[0168] 分析图像,以检测培养装置的生长区域中的气泡;以及

[0169] 将多个气泡分类,其中将多个气泡分类包括根据与多个气泡中的每个气泡相关联的尺寸参数来将每个气泡分配至第一组或第二组。

[0170] 实施例II是根据实施例HH所述的计算机可读介质,其中所述计算机可读指令还致使处理器确定在第一区域、第二区域或第三区域中的任一区域中的气泡是否分配至第一组或第二组。

[0171] 实例

[0172] 实例1.用于检测产气菌落的方法

[0173] 胰蛋白酶大豆肉汤(TSB,目录#K89)得自加利福尼亚州圣玛丽亚的哈迪诊断公司(Hardy Diagnostics(Santa Maria,CA))。微生物菌株大肠杆菌(ATCC 25922)、大肠杆菌(3M-FR4)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)(ATCC 51812)和栖水肠杆菌(*Enterobacter amnigenus*)(ATCC51898)得自明尼苏达州圣克劳德的Microbiologics公司(Microbiologics Inc(St Cloud,MN))。对于每种微生物菌株制备过夜TSB培养物。薄膜培养装置(3M PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数(EC)板)和巴特菲尔德(Butterfield)的磷酸盐缓冲液均得自明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company(St.Paul,MN))。

[0174] 来自每种菌株的过夜培养物的稀释物在巴特菲尔德的磷酸盐缓冲液中制备,以获得大约25个菌落形成单位(CFU)/mL。通过提升透明膜覆盖片,将1mL稀释样品吸取到带涂层的底部膜的中心并替换覆盖片来接种3M PETRIFILM板。使用由制造商(3M)提供的分布装置来将样品均匀分布至所需表面积(大约20cm<sup>2</sup>)。将温育板在35°C下温育24小时。

[0175] 使用培养装置成像系统来成像并识别PETRIFILM培养板上的菌落。成像系统含有位于中心的玻璃台板(白色套料乳白玻璃(White Flashed Opal Glass)),其用作培养板放置的平台。培养板使用两组分开的发光二极管(每组含有两个红色LED、两个绿色LED和两个蓝色LED)进行照射。一组定位在培养板的左侧上方(相对于纵向维度),并且另一组定位在

右侧上方(相对于培养板的纵向维度)。来自定位在培养装置上方的LED的光背离培养装置并进入光漫射反射表面中,其将基本上均匀的照明模式导向培养板的前侧上。类似地,培养板使用两组分开的发光二极管(每组含有两个红色LED、两个绿色LED和两个蓝色LED)在背侧上进行照射。一组定位在培养板的左侧下方(相对于纵向维度),并且另一组定位在右侧下方(相对于培养板的纵向维度)。来自定位在培养装置下方的LED的光背离培养装置并进入光漫射反射表面中,其将基本上均匀的照明模式导向玻璃台板(上文描述)的背侧上,并且在培养板的背侧上产生均匀的照明模式。

[0176] Aptina型号MT9P031 CMOS成像传感器(加利福尼亚州圣何塞的Aptina成像公司(Aptina Imaging(San Jose,CA))正交放置在平台上方并定位为获取培养板的图像。调整成像传感器和平台,使得培养板置于传感器的焦平面内。将培养板在平台上进行取向,使得培养板的前侧(透明膜侧)面对成像传感器。背部覆盖件用于使成像装置与室内光线隔离。选择图像暴露,使得在采集的图像中所有图像像素的柱状图中的小于约10%像素是饱和的。使用仅来自培养板前侧的照明获取第一图像,并且使用仅来自培养板背侧的照明获取第二图像。两个图像均在培养板维持在平台上完全相同的位置中时获取(即,板不从平台移开直至采集两个图像时)。这允许通过匹配相应的X-Y坐标位置来识别两个图像中的一致菌落。

[0177] 两个图像使用ImagePro Plus软件(马里兰州洛克维尔的Media Cybernetics公司(Media Cybernetics(Rockville,MD))进行分析。单独菌落的尺寸由第一培养板图像(100%前侧照明)进行测定。成像程序分析沿一行像素观察到的红色、绿色和蓝色像素强度中的变化,所述像素行并入可疑菌落图像的最长尺寸。限定相对于局部背景在强度中的变化的像素位置用于标记菌落图像的边际,并测量菌落直径(直径距离报告为位于标记菌落边际的像素点之间的像素数目)。

[0178] 气泡的直径使用第二培养板图像(100%背侧照明)进行测定。成像程序分析沿一行像素观察到的像素颜色强度中的变化,所述像素行并入气泡图像的最长尺寸。使用RGB(红色/绿色/蓝色)图像处理技术,其中绿色通道提供最大对比度,以识别在该培养装置中使用的特定生长培养基中的气泡。识别其中相对于局部背景颜色强度发生像素颜色强度中的急剧减少的像素位置,并标记为限定在气泡的周边处的暗环带的位置。气泡的直径通过计数在两个识别的像素位置之间的像素数目进行测量。

[0179] 在下一步中,成像程序比较气泡图像的尺寸和接近两者(得自第二培养板图像)与最近的菌落图像的尺寸和位置(得自第一培养板图像),并且应用上文描述的气泡尺寸和接近标准。根据该标准,可得出结论,即图6中的气泡81、82和83均与菌落71相关联,并且另外,至少气泡81与菌落73相关联。还可得出结论,即在图6中不存在与菌落72相关联的生物成因气泡。

[0180] 在任何情况下,可做出各种修改,而不背离本发明的实质和范围。例如,取决于所需实现,本文描述的规则中的一种或多种可连同或不连同其他规则一起使用,并且规则的多个子集可按任何次序应用。这些和其他实施例均在所附权利要求书的范围内。

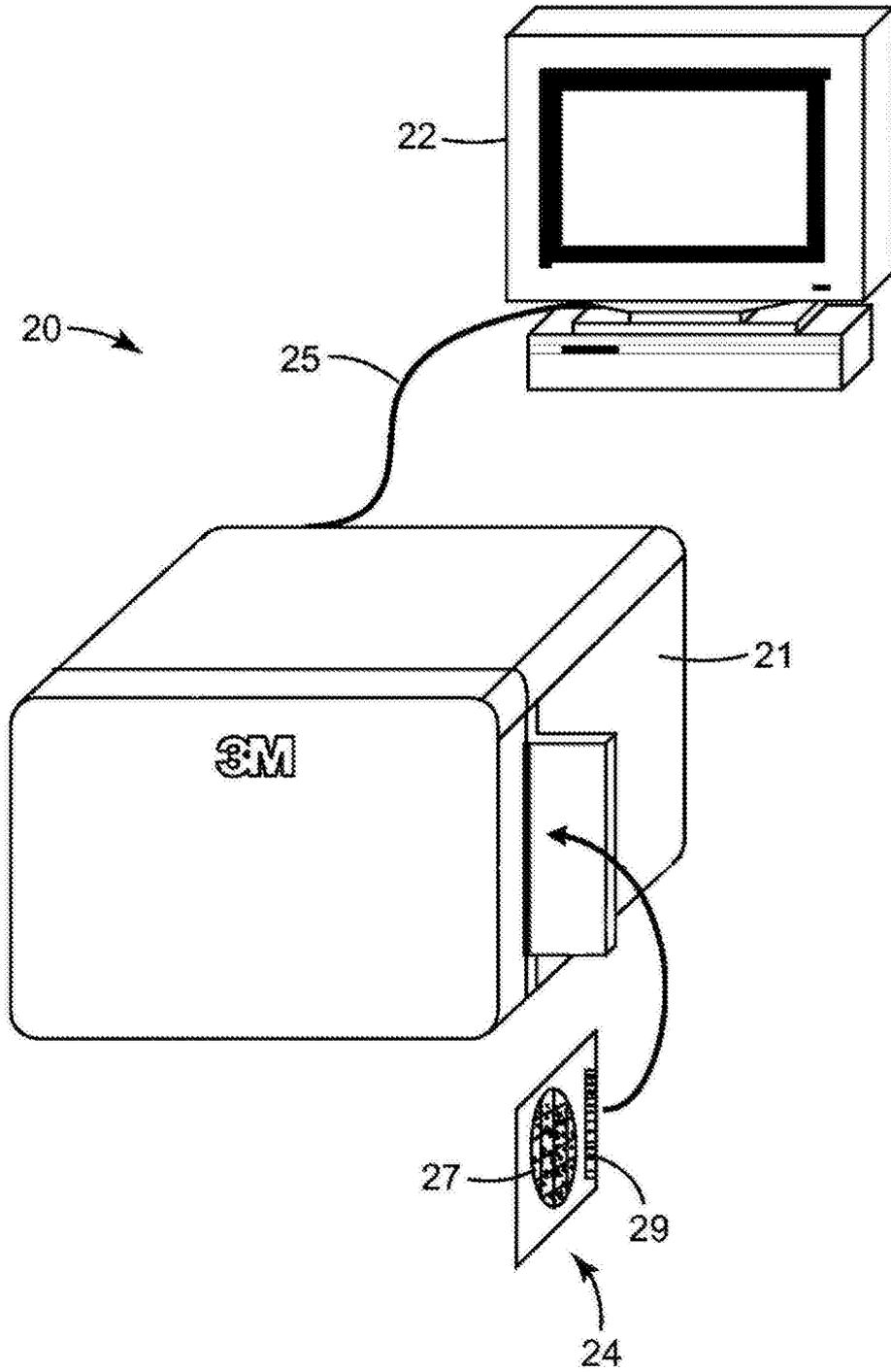


图1

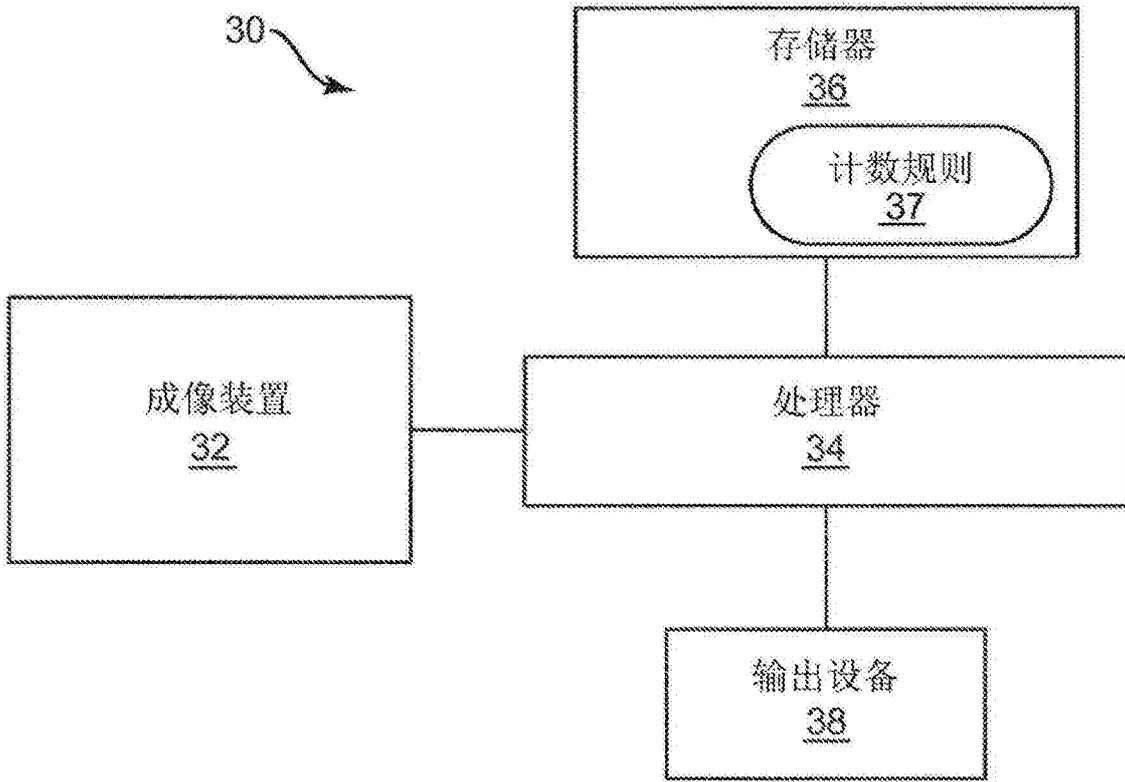


图2

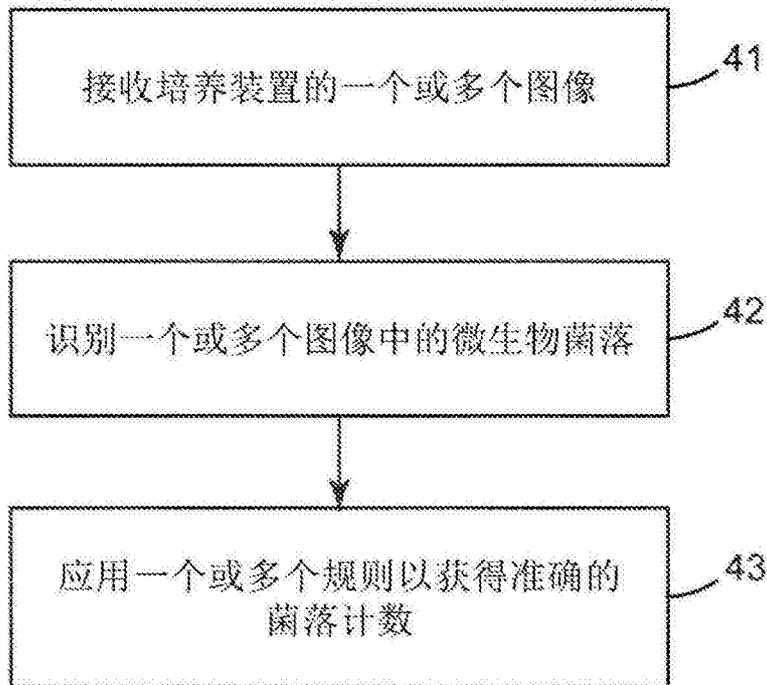


图3

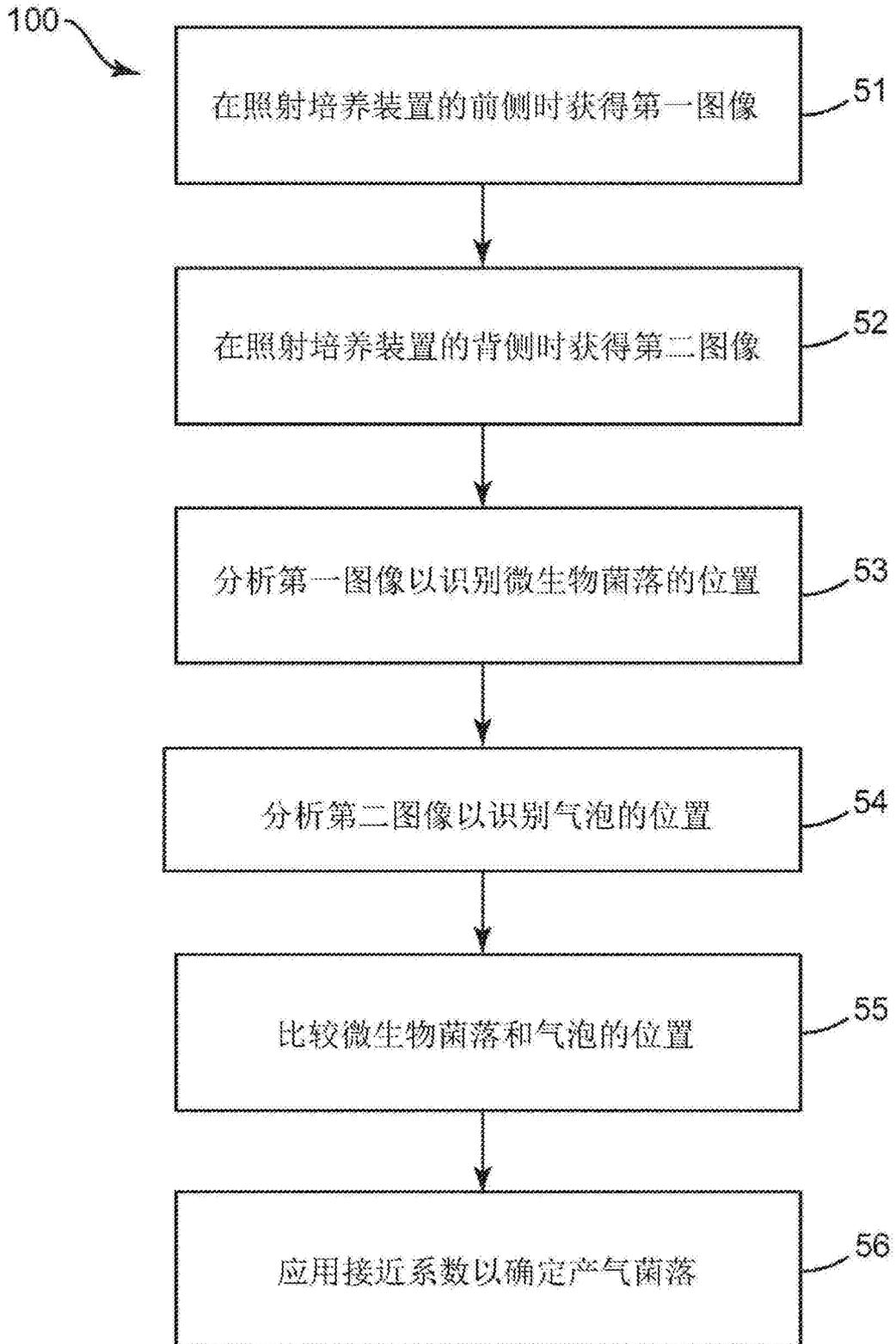


图4

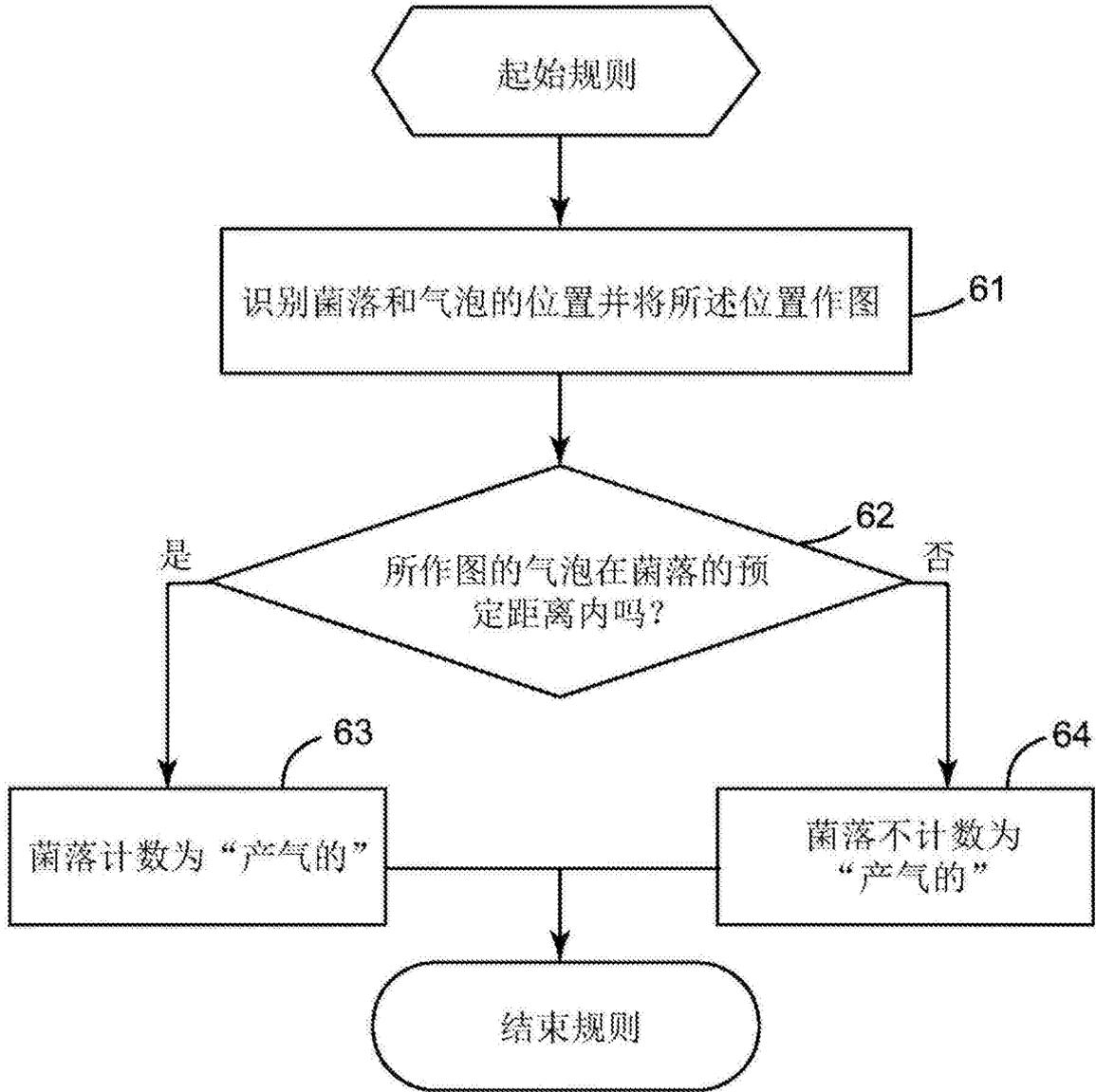


图5

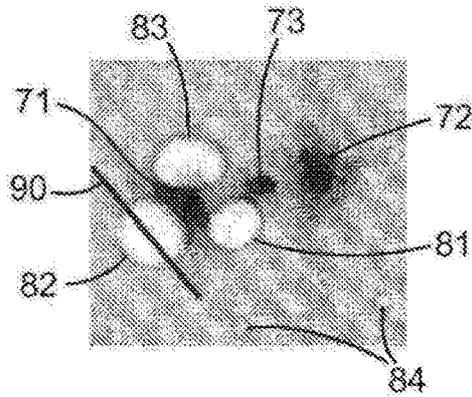


图6

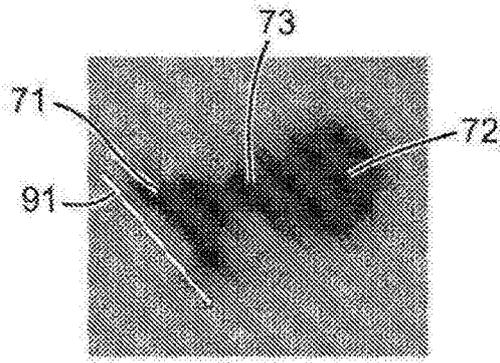


图7

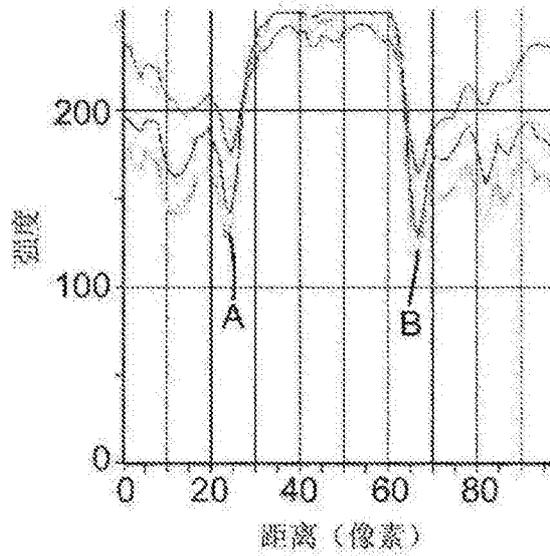


图8

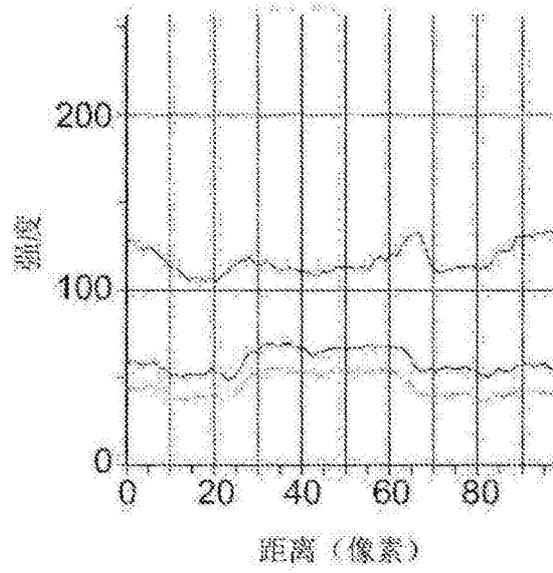


图9

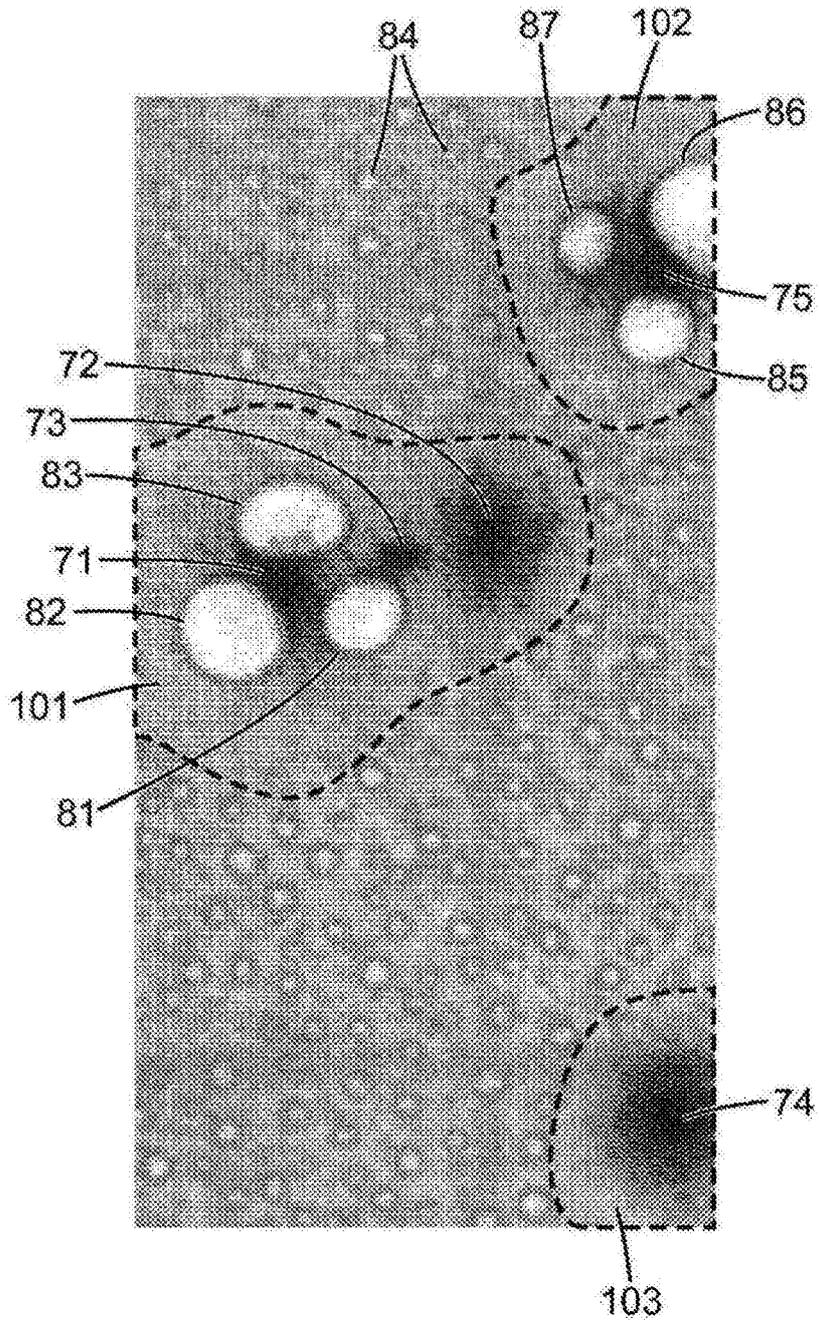


图10A

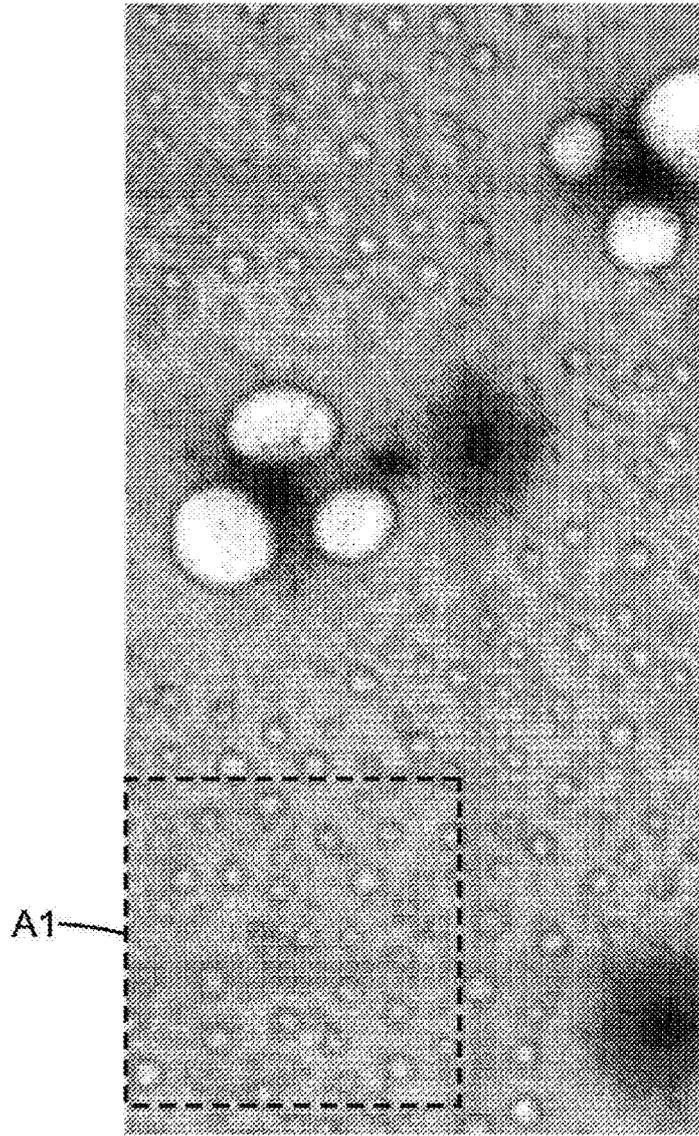


图10B

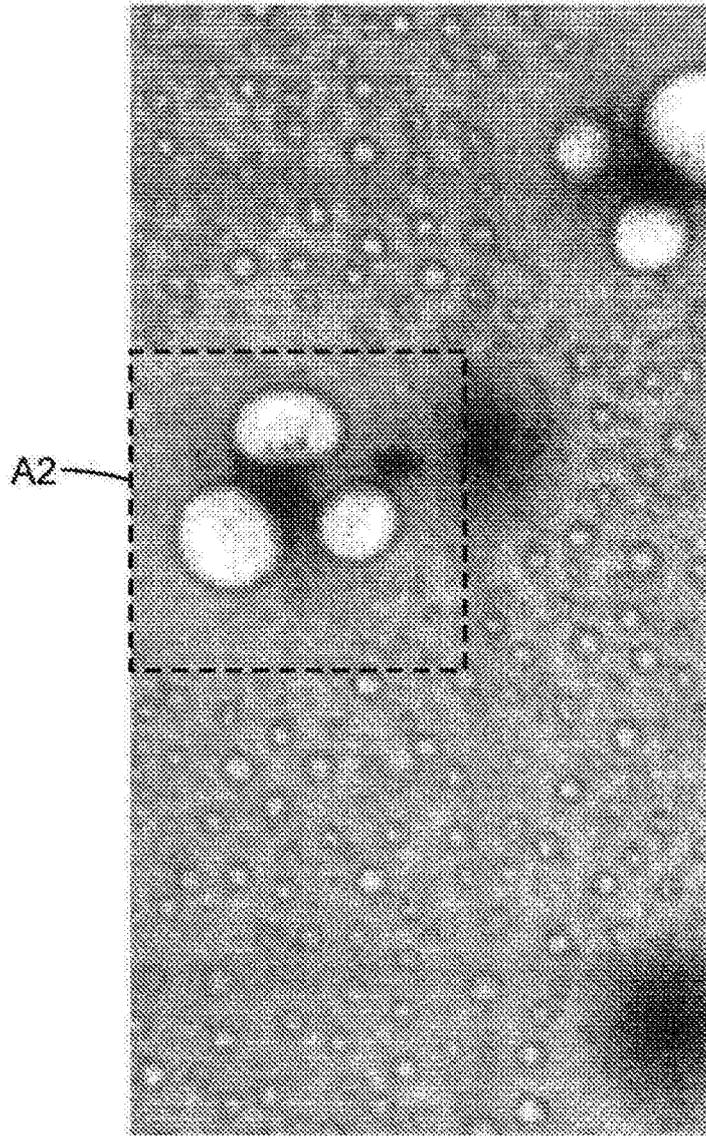


图10C

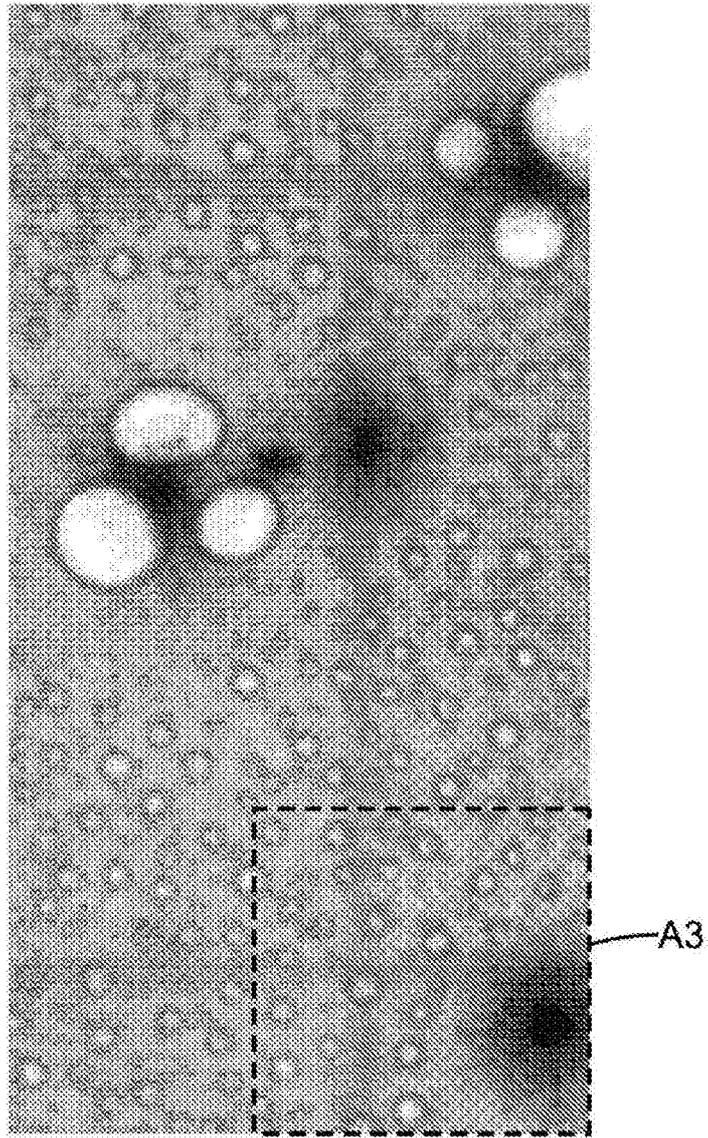


图10D