



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104870650 B

(45)授权公告日 2018.09.11

(21)申请号 201380066662.2  
 (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 104870650 A  
 (43)申请公布日 2015.08.26  
 (30)优先权数据  
 61/739,786 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/US2013/074882 2013.12.13  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02014/099643 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  
 (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 梁晓广 关兆辉

(51)Int.Cl.  
 C12Q 1/04(2006.01)  
 G06K 9/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 101641448 A,2010.02.03,  
 CN 102325894 A,2012.01.18,  
 CN 102713617 A,2012.10.03,  
 CN 102803504 A,2012.11.28,  
 CN 1123561 A,1996.05.29,  
 Weixing Wang.colony image acquisition  
 system and segmentation algorithms.  
 《Optical Engineering》.2011,1-8.  
 3M.Interpretation Guide-3M Petrifilm  
 E.coli and Coliform Count Plates.《http://  
 jornadas.uab.cat/workshopmrama/sites/  
 jornadas.uab.cat/workshopmrama/files/  
 Petrifilm\_guides.pdf》.2008,1-7.

审查员 宋梦

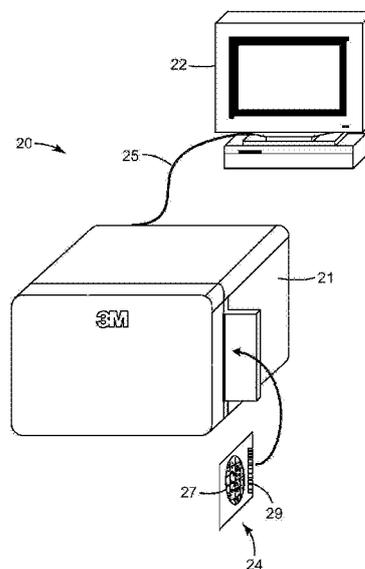
权利要求书1页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

区别图像中的微生物菌落的方法

(57)摘要

本发明提供了识别培养装置中的微生物菌落的方法。该方法包括使用成像装置在对装置的前侧提供照明时产生薄膜培养装置的第一图像，且在对装置的背侧提供照明时产生薄膜培养装置的第二图像。该方法还包括分析第一图像和第二图像，以识别每个图像中的微生物菌落，分析关于培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一图像值和第二图像值，并且比较该值。该方法可用于区别且计数至少两个菌落类型。



1. 一种识别培养装置中的微生物菌落的方法,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以前侧照明与背侧照明的第一比率照射所述培养装置时产生的;

其中所述培养装置包括第一指示剂化合物和第二指示剂化合物;

其中所述第一指示剂化合物由微生物转化为具有第一颜色的不可扩散的第一产物;

其中所述第二指示剂化合物由微生物转化为形成第二颜色的水可扩散的第二产物;

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以前侧照明与背侧照明的第二比率照射所述培养装置时产生的;

其中所述第二比率低于所述第一比率;

分析所述第一图像和所述第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;

分析所述第一图像,以计算针对在所述培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值,所述尺寸参数是所述菌落的观察直径;

分析所述第二图像,以计算在所述培养装置中的所述特定位置处的所述尺寸参数的第二值;

比较所述第一值与所述第二值;以及

计数所述菌落,其中基于所述第一值与所述第二值相同,所述菌落计数为第一组微生物,其中基于所述第一值与所述第二值不同,所述菌落计数为不同的第二组微生物,其中如果所述第一值和所述第二值在预定范围内,则所述第一值和所述第二值被认为相同。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一比率大于1:1。

3. 根据权利要求1所述的方法,还包括使用所述第一图像和所述第二图像来计数所述培养装置中的第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一指示剂化合物包括四唑染料。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二指示剂化合物包括具有吡啶基团的显色酶底物。

## 区别图像中的微生物菌落的方法

### [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号61/739,786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。特别地,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,以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内。在温育后,可将培养装置置于生物扫描单元内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而改善生物测试过程。

### 发明内容

[0007] 一般来讲,本公开内容涉及用于区分扫描图像中的物体的技术。特别地,该技术用于区别培养基中存在的两类微生物菌落,所述培养基包括每类微生物可与之反应的两种指示剂化合物。另外,该技术还可用于计数培养装置的扫描图像中的每类微生物菌落的数目。为了计数菌落,将含有培养基的培养装置插入扫描单元内。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诸如台式计算机、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微生物菌落的数目。依照本发明,描述了区分菌落类型的方法。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,本公开内容提供了一种方法。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;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;分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;分析第一图像,以计算针对在培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值;分析第二图像,以计算在培养装置中的特定位置处的尺寸参数的第二值;并且比较第一值与第二值。第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的。培养装置包括第一指示剂化合物和第二指示剂化合物,其中所述第一指示剂化合物由微生物转化为具有第一颜色的第一产物,其中所述第二指示剂化合物由微生物转化为形成第二颜色的水可扩散的第二产物。

[0009] 在上述实施例的任一个中,第一图像是可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,并且第二图像是可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。在一些实施例中,第一比率可大于1:1。在一些实施例中,第一比率可为约100%:0%。在一些实施例中,第二比率可为约0%:100%。

[0010] 在上述实施例的任一个中,该方法还可包括使用第一图像或第二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培养装置中的第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。在一些实施例中,第一类菌落可将第一指示剂转化为第一产物。在一些实施例中,第二类菌落将第二指示剂转化为第二产物。

[0011] 在上述实施例的任一个中,第一指示剂化合物可包括四唑染料。在上述实施例的任一个中,第二指示剂化合物可包括具有吡啶基团的显色酶底物。在上述实施例的任一个中,尺寸参数可为观察的菌落直径。在一些实施例中,菌落参数可为菌落最小直径。

[0012] 在另一个方面,本公开内容提供了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可致使包括处理器的培养板扫描系统获得薄膜培养装置的第一图像,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;获得薄膜培养装置的第二图像,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;分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;分析第一图像,以计算针对在培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值;分析第二图像,以计算在培养装置中的特定位置处的尺寸参数的第二值;并且比较第一值与第二值。在任何实施例中,计算机可读介质还可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或第二图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。在任何实施例中,计算机可读介质还可包括计算机可读指令,所述计算机可读指令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第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。

[0013] 本发明的多个方面可提供许多优点。例如,本公开内容的方法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,本文描述的规则可解决通常发生且可以其他方式破坏生长板上的试剂的自动化计数准确度的问题。

[0014] 下面将结合附图和具体实施方式介绍这些及其他实施例的更多细节。通过具体实施方式、附图和权利要求书,其他特征、对象和优点将变得明显。

## 附图说明

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 图3是示出微生物培养装置的自动化分析的过程的流程图。

[0018] 图4是根据本公开内容分析微生物培养装置的方法的一个实施例的框图。

[0019] 图5是根据本公开内容区分微生物菌落类型的计数规则的流程图。

[0020] 图6是在其中具有两类微生物菌落生长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背侧时获得。

[0021] 图6A是图6的图像的一部分的详细视图;

[0022] 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。

[0023] 图7A是图7的图像的一部分的详细视图;

[0024] 图8是图6A的行扫描中的像素各自的红色、绿色和蓝色组分的相对强度的图。

[0025] 图9是图7A的行扫描中的像素各自的红色、绿色和蓝色组分的相对强度的图。

### 具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 广泛使用的用于检测物质(例如食物、水、环境残余)中的微生物存在的操作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。本公开内容的方法使用生长且计数微生物菌落的此类培养装置执行。通常,培养装置包括水性营养培养基和基质(例如胶凝剂,诸如琼脂、瓜尔胶或果胶),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。用于生长和计数微生物菌落的培养装置包括例如琼脂培养皿以及由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包括例如美国专利号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。

[0028] 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,它改善菌落和培养基之间的颜色对比度),并且颜色变化还可作用于将与特定指示剂化合物反应的特定菌落和与指示剂化合物反应的另一微生物菌落相区别。

[0029] 用于生长且区别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含有氧化还原指示剂(氯化三苯基四唑,下文“TTC”)和显色酶底物(5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸,下文“X-gluc”)。TTC与微生物细胞反应,以形成略带红色的甲口,其染色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。相比之下,X-gluc仅与这样的细菌反应,除能够在选择性生长培养基中生长之外,所述细菌还具有b-D-葡萄糖苷酸酶活性(例如具

有b-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,所述靛青染料将菌落的细胞群染成蓝色,并且在具有b-D-葡糖苷酸酶活性的菌落周围形成蓝色晕圈(即,指示剂的扩散区)。

[0030] 考虑即使微生物细胞与指示剂化合物反应以形成基本上相同颜色的产物,本公开内容的方法也可基于其与多种指示剂化合物中的一种或多种的反应用于区分微生物菌落。当指示剂化合物之一的产物保持与微生物菌落的细胞群结合,并且另一指示剂化合物的产物扩散到菌落的细胞群周围的培养基内时,这是可能的。

[0031] 在本公开内容的方法中,根据本领域众所周知的程序将样品制备,接种到培养装置内且温育。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。

[0032] 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且应用多种图像分析方案,可检测且计数微生物菌落。用于计数和/或区别培养装置中的微生物菌落的成像系统例子可在国际公开号W0 98/59314;以及美国专利号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例子可在美国专利号6,058,209和6,243,486中找到,所述专利全文以引用方式并入本文中。

[0033] 本公开内容涉及用于计数培养装置中的微生物菌落的技术。该技术可用于改善培养装置中的微生物菌落的自动化计数的准确度。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中的处理器执行。作为另外一种选择,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)或本领域已知的多种硬件部件中实现。取决于被扫描的生长培养基,本文描述的多种规则可单独应用,或以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,可改善培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0034] 在任何实施例中,本公开内容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号W0 96/18720、W0 96/18167、W0 2005/062744中描述,所述专利均全文以引用方式并入本文中。

[0035] 图1显示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22执行由扫描仪生成的图像的成像分析。外部计算机22可包括例如按程序工作于培养装置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,以促进由扫描仪21生成的培养装置24的图像的图像分析。

[0036] 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、外部控制器(PCI)接口、常规串行或并行接口、无线连接等等。

[0037] 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均

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,且生成标记29的图像,并且随后将培养装置24拉动到第二位置,且生成生长区域27的图像。以这种方式,可通过系统20生成培养装置的标记29和生长区域27的图像。作为另外一种选择,单个图像可捕获标记29和生长区域27两者。在任一情况下,标记29的扫描均可有利于被使用的板类型的识别,使得一种或多种期望计数规则可以自动化形式应用。

[0038] 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可用于促进通常与食物污染相关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、大肠菌群、肠杆菌、酵母、霉菌、金黄色葡萄球菌、李斯特氏菌属、弯曲杆菌属等等。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,本发明还可对广泛多样的其他类型的生长培养基应用。

[0039] 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(例如厚大约1-2mm)的培养基的组合提供了对于根据本公开内容区分菌落有益的光学条件。

[0040] 为了改善培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度,本公开内容的方法的多个方面建立了可在图像处理期间应用的规则。换言之,下文更详细地描述的规则可构成系统20中执行的菌落计数算法的一部分。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,或以与其他图像分析规则(国际专利公开号W02005/062744中所述的计数规则,所述专利以引用方式并入本文中)的任何组合使用。通过改善生长培养基诸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,计数规则中的一种或多种的应用可改善生物扫描系统诸如系统20。

[0041] 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且对处理器34提供图像。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,其有利于由成像装置32生成的图像的图像分析。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测定的结果并且将结果提供给用户。

[0042] 例如,成像装置32可包括2维单色照相机,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,控制器(未示出)可控制关于培养装置的每个图像的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例子在美国专利号8,094,916(其全文以引用方式并入本文中)中描述,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。

[0043] 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,并且使用来自照射培养装置前侧的照明器的0%照明和来自照射培养装置背侧的照明器的100%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,并且使用来自照射培养装置前侧的照明器的20%照明和来自照射培养装置背侧的照明器的80%照明,可获得第二图像。前侧照明与背侧照明的比率可选择为提供培养装置中的特定类型的营养培养基的最佳对比度。

[0044] 在该方法的任何实施例中,第一图像是在以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,并且第二图像是在以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。

[0045] 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获得。推荐第一图像和第二图像及时足够紧密地获得,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。

[0046] 本领域普通技术人员将认识到,在其中成像装置放置面对培养装置的前侧,并且照明器也放置为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含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,在其中成像装置放置面对培养装置的前侧,并且照明器也放置为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含由培养装置及其内容物透射和/或折射的光。

[0047] 图像被提供给处理器34且还可存储于存储器36中。在任何情况下,图像均通过应用计数规则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。

[0048] 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。作为另外一种选择,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均执行多种计数规则37,以改善培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0049] 存储器36是计算机可读介质的一个例子,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)、电可擦除可编程只读存储器(EEPROM)、闪速存储器等等。计数规则37例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。

[0050] 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例如打印机等等。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,例如外部计算机22的显示屏(图1)。

[0051] 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,以计数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下文讨论。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,识别在培养装置上的生长区域和细菌菌落的自动化计数。

[0052] 依照本发明,处理器34应用一种或多种规则,以改善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。规则可单独地从存储器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,则规则在其中应用的次序可基于被扫描的板类型加以选择。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。

[0053] 图4显示了根据本公开内容的方法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和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落的步骤53。

[0054] 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限定图像中的物体。因此,分析第一图像和第二图像,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,识别图像中的微生物菌落的技术(美国专利号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配置为检测颜色为红色的阴影,并且检测与包含5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸的指示剂化合物反应的微生物菌落的方法可配置为检测颜色为蓝色的阴影。

[0055] 在方法的优选实施例中,具有第二指示剂的薄膜培养装置从背侧照射,所述第二指示剂是包括吡啶基团的显色酶底物,并且用导致图像接近饱和的照明强度和整合时间(即曝光时间)获取图像。在该优选实施例的条件下,由微生物菌落的细胞群限定的图像中的区域可看起来明显暗(即允许更少的光透射率)于菌落周围的有色产物区(即来自显色酶底物)。这有利于区别相对更小的微生物菌落与菌落周围相对更大的有色产物(即来自酶反应)的有色区。例如,在这些条件下,成像处理器可基于区域的颜色强度中的差异,容易地区别菌落群边缘与菌落周围的有色产物边缘(例如菌落图像和菌落周围的有色区图像之间的亮度中的差异,如果存在的话)。

[0056] 分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落还包括识别图像中检测到的任何菌落的位置。该位置将用于识别且比较与每个图像中的一致菌落相关的可测量参数。该位置可通过每个图像中的X-Y坐标进行识别。因此,在优选实施例中,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。作为另外一种选择,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,以便测定第一图像和第二图像中的一致菌落。

[0057] 在分析第一图像和第二图像,以识别一致菌落后,分析第一图像和第二图像,以计算与关于每个一致菌落的尺寸参数相关的值。尺寸参数可为例如平均菌落直径、最小菌落直径、最大菌落直径或菌落面积。因此,计算关于第一图像中的特定菌落的第一尺寸参数值(图4,步骤54),并且计算关于第二图像中的相应一致菌落的第二尺寸参数值(图4,步骤55)。

[0058] 方法100还包括比较第一尺寸参数值与第二尺寸参数值的步骤(56)。如果由给定菌落的第一图像计算的第一尺寸参数值在由给定菌落的第二图像计算的第二尺寸参数值的预定范围(例如80%至120%、90%至110%或95%至105%)内,则该菌落计数为属于第一组(例如组“A”:可能的非大肠杆菌微生物)的菌落。在这种情况下,组“A”微生物与产生不可扩散的产物的第一指示剂化合物(例如TTC)反应,但不与产生可扩散产物的第二指示剂化合物(例如5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸)反应。

[0059] 相反,如果由给定菌落的第一图像计算的第一尺寸参数值大于由给定菌落的第二图像计算的第二尺寸参数值(例如比第二尺寸参数值大至少20%、大至少50%、或大至少100%),则该菌落计数为属于第二组(例如组“B”:可能的大肠杆菌微生物)的菌落。在这种情况下,组“B”微生物与产生不可扩散的产物的第一指示剂化合物(例如TTC)反应,且与产生可扩散产物的第二指示剂化合物(例如5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸)反应,这导致第一尺寸参数值大于第二尺寸参数值。

[0060] 图5是示出根据本公开内容将菌落区别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位置且将所述菌落位置作图(步骤61)。特别地,处理器34测定第一图像图中识别的菌落是否对应于在第二图像中识别为菌落的相同位置(步骤62)。如果在第一图像和第二图像中发现一致菌落,则处理器34计算关于一致菌落的尺寸参数值,并且比较该值以测定它们是否不同(步骤63)。如果值并无不同(例如在如上所述的预定范围内),则培养装置中的菌落计数为第一类型(“类型A”,如步骤64中所示)。如果值不同(例如第一图像的值小于第二图像的值),则培养装置中的菌落计数为第二类型(“类型B”,如步骤65中所示)。例如,类型“A”菌落在PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板中可与TTC反应,但不与5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸反应,并且因此将被识别为非大肠杆菌菌落。相反,类型“B”菌落在PETRIFILM大肠杆菌/大肠菌群计数板中可与TTC和5-溴-4-氯-3-吡啶基-b-D-葡萄糖苷酸反应,并且因此将被识别为大肠杆菌菌落。

[0061] 分析图像可包括RGB(红色/绿色/蓝色)图像处理算法。作为另外一种选择或另外地,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)算法或其组合。

[0062] 图6显示在其中具有两类微生物菌落生长的薄膜培养装置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,包括分别为两个不同类型“A”和“B”的菌落。属于类型“A”的菌落与第一指示剂化合物反应,所述第一指示剂化合物与细菌菌落的细胞群反应且将细菌菌落的细胞群染色。属于类型“B”的菌落与第一指示剂化合物相互作用,并且另外还与第二指示剂化合物反应,所述第二指示剂化合物对微生物菌落和/或菌落周围的培养基赋予颜色变化。属于类型A(第一菌落74)和类型B(第二菌落75)的代表性菌落的直径根据实例1中所述的技术进行测定。数据(下表1中列出)显示背部照射图像中的第一菌落74的直径是22个像素,并且背部照射图像中的第二菌落75的直径是15个像素。因此,图6显示使用这类照明(即,背侧照明),属于两个类型(A和B)的代表性菌落的尺寸参数(即菌落直径)可具有大致相同的量级。图6A中还显示的是生长区域的一部分的行扫描的路径91,所述生长区域的一部分包括至少一个微生物菌落。

[0063] 图7显示图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。第一菌落74和第二菌落75的直径根据实例1中所述的技术进行测定。数据显示前部照射图像中的第一菌落74的直径是22个像素,并且前部照射图像中的第二菌落75的直径是45个像素。因此,图7显示使用这类照明(即,前侧照明),属于两个类型(A和B)的代表性菌落的尺寸参数(即菌落直径)可具有不同的量级(例如,基本上不同的量级)。图7A中还显示的是生长区域的一部分的行扫描的路径92,所述生长区域的一部分包括至少一个微生物菌落。路径92对应于与图6A的路径91中的那些相同的像素。

[0064] 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或其他物体边缘的颜色和/或强度转化。图8显示得自沿图6A的背光图像中的路径91的像素的红色、绿色和蓝色的透射像素强度的图。两个负峰(分别为“1”和“2”)各自显示各自菌落的中心暗于生长培养基的接近背景,由此明确指示两种不同菌落的存在。图9显示得自沿图7A的前光图像中的路径92的像素的红色、绿色和蓝色的反射颜色强度的图。图9显示在包含菌落中心的像素和包含邻近菌落的生长培养基的像素之间的像素强度中的较小差异。

[0065] 使用扫描系统与计数规则区别微生物菌落已得到描述。计数规则可用于扫描系统中,以改善培养装置上的微生物菌落的自动化计数的准确度。

[0066] 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瞬态性计算机可读介质,例如随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、非易失性随机存取存储器(NVRAM)、电可擦除可编程只读存储器(EEPROM)、闪速存储器等等。计算机可读介质还可包括非易失性存储器例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,例如用于经过网络例如因特网递送软件。

[0067] 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其任何组合内的实现。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。

#### [0068] 实施例

[0069] 实施例A为一种方法,其包括:

[0070] 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;

[0071] 其中所述第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的;

[0072] 其中所述培养装置包括第一指示剂化合物和第二指示剂化合物;

[0073] 其中所述第一指示剂化合物由微生物转化为具有第一颜色的第一产物;

[0074] 其中所述第二指示剂化合物由微生物转化为形成第二颜色的水可扩散的第二产物;

[0075] 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;

[0076] 分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;

- [0077] 分析第一图像,以计算针对在培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值;
- [0078] 分析第二图像,以计算在培养装置中的特定位置处的尺寸参数的第二值;以及
- [0079] 比较第一值与第二值。
- [0080] 实施例B是实施例A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。
- [0081] 实施例C是实施例B的方法,其中所述第一比率大于1:1。
- [0082] 实施例D是实施例B的方法,其中所述第一比率为约100%:0%。
- [0083] 实施例E是实施例B到D中任何一个的方法,其中所述第二比率为约0%:100%。
- [0084] 实施例F是前述实施例中任何一个的方法,还包括使用第一图像或第二图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。
- [0085] 实施例G是前述实施例中任何一个的方法,还包括使用第一图像和第二图像来计数培养装置中的第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。
- [0086] 实施例H是实施例G的方法,其中所述第一类菌落将第一指示剂转化为第一产物。
- [0087] 实施例I是实施例G或实施例H的方法,其中所述第二类菌落将第二指示剂转化为第二产物。
- [0088] 实施例J是前述实施例中任何一个的方法,其中所述第一指示剂化合物包括四唑染料。
- [0089] 实施例K是前述实施例中任何一个的方法,其中所述第二指示剂化合物包括具有吡啶基团的显色酶底物。
- [0090] 实施例L是前述实施例中任何一个的方法,其中所述尺寸参数是观察的菌落直径。
- [0091] 实施例M是实施例L的方法,其中所述菌落直径是菌落最小直径。
- [0092] 实施例N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培养板扫描系统:
- [0093] 获得薄膜培养装置的第一图像,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;
- [0094] 获得薄膜培养装置的第二图像,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;
- [0095] 分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;
- [0096] 分析第一图像,以计算针对在培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值;
- [0097] 分析第二图像,以计算在培养装置中的特定位置处的尺寸参数的第二值;以及
- [0098] 比较第一值与第二值。
- [0099] 实施例O是实施例N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或第二图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。
- [0100] 实施例P是实施例N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

养装置中的第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。

[0101] 实施例Q为一种方法,其包括:

[0102] 使用成像装置来产生培养装置的第一图像,所述培养装置具有前侧和相对该前侧的背侧;

[0103] 其中所述第一图像是在对装置的前侧提供照明时产生的;

[0104] 其中所述培养装置包括第一指示剂化合物和第二指示剂化合物;

[0105] 其中所述第一指示剂化合物由微生物转化为具有第一颜色的第一产物;

[0106] 其中所述第二指示剂化合物由微生物转化为形成第二颜色的水可扩散的第二产物;

[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] 分析第一图像和第二图像,以识别每个图像中的微生物菌落;

[0109] 分析第一图像,以计算针对在培养装置中的特定位置处的菌落的尺寸参数的第一值;

[0110] 分析第二图像,以计算在培养装置中的特定位置处的尺寸参数的第二值;以及

[0111] 比较第一值与第二值。

[0112] 实施例R是实施例Q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。

[0113] 实施例S是实施例R的方法,其中所述第一比率为约100%:0%。

[0114] 实施例T是实施例R或实施例S的方法,其中所述第二比率为约0%:100%。

[0115] 实施例U是实施例Q到T中任何一个的方法,其中在产生所述第一图像和所述第二图像时,将光漫射器设置接近培养装置的背侧。

[0116] 实施例V是实施例Q到U中任何一个的方法,还包括使用第一图像或第二图像来计数培养装置中的微生物菌落数目。

[0117] 实施例W是实施例Q到V中任何一个的方法,还包括使用第一图像和第二图像来计数培养装置中的第一类菌落数目和计数第二类菌落数目。

[0118] 实施例X是实施例W的方法,其中所述第一类菌落将第一指示剂转化为第一产物。

[0119] 实施例Y是实施例W或实施例X的方法,其中所述第二类菌落将第二指示剂转化为第二产物。

[0120] 实施例Z是实施例Q到Y中任何一个的方法,其中所述第一指示剂化合物包括四唑染料。

[0121] 实施例AA是实施例Q到Z中任何一个的方法,其中所述第二指示剂化合物包括具有吡啶基团的显色酶底物。

[0122] 实施例BB是实施例Q到AA中任何一个的方法,其中所述第一比率为约100%:0%,其中所述第二比率为约0%:100%。

[0123] 实施例CC是实施例Q到BB中任何一个的方法,其中所述尺寸参数是菌落直径。

[0124] 实施例DD是实施例CC的方法,其中所述菌落直径是菌落最小直径。

[0125] 实例

[0126] 用于检测大肠杆菌菌落的方法

[0127] 胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB, 目录#K89) 得自哈迪诊断公司 (Hardy Diagnostics) (加利福尼亚州圣玛丽亚 (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 Microbiologics Inc (明尼苏达州圣克劳德 (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 3M 公司 (明尼苏达州圣保罗 (St. Paul, MN))。

[0128] 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, 并且替换覆盖片, 来接种 3M PETRIFILM 板。使用由制造商 (3M) 提供的铺展装置, 将样品均匀铺展至所需表面积 (大约 20cm<sup>2</sup>)。将温育板在 35℃ 下温育 24 小时。

[0129] 使用培养装置成像系统, 成像且识别 PETRIFILM 培养板上的菌落。成像系统含有有定位在中心的玻璃台板 (白色套料乳白玻璃 (White Flashed Opal Glass)), 其充当培养板放置的平台。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) 在前侧上进行照射。一组定位在培养板的左侧上方 (相对于纵向尺度), 并且另一组定位在右侧上方 (相对于培养板的纵向尺度)。来自定位在培养装置上方的 LED 的光背离培养装置且进入光漫射反射表面内, 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 (相对于纵向尺度), 并且另一组定位在右侧下方 (相对于培养板的纵向尺度)。来自定位在培养装置下方的 LED 的光背离培养装置且进入光漫射反射表面内, 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。

[0130] Aptina 型号 MT9P031 CMOS 成像传感器 (Aptina 成像公司, 加利福尼亚州圣何塞 (Aptina Imaging, San Jose, CA)) 正交定位在平台上方, 以便获取培养板的图像。调整成像传感器和平台, 以使得培养板定位在传感器的焦平面内。将培养板在平台上进行取向, 以使得培养板的前侧 (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, 以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确切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。

[0131] 两个图像使用 ImagePro Plus 软件 (Media Cybernetics 公司, 马里兰州洛克维尔 (Media Cybernetics, Rockville, MD)) 就菌落类型进行分析。对于每个图像, 通过测量菌落直径来测定单独菌落的尺寸。成像程序分析沿一行像素观察的红色、绿色和蓝色像素强度中的变化, 所述像素行掺入可疑菌落图像的最长尺度。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, 且测量菌落直径 (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)。随后比较两个图像中的一致菌落的直径测量, 以测定菌落类型。关于培养板上的三个代表性菌落的结果呈现于表 1 中。菌落指定为 1 和 2; 分别对应于

图6和图7中分别的菌落74和菌落75。

[0132] 表1.

[0133]

菌落命名	菌落直径（前侧照明） （像素）	菌落直径 （背侧照明） （像素）	菌落直径测量的 差异（像素）	菌落类型**
1	22	22	0	非大肠杆菌
2	45	15	30	大肠杆菌
3	100*	22	78	大肠杆菌
4	100*	23	77	大肠杆菌

[0134] \*菌落3和菌落4均由单个、扩散的蓝色晕圈（即，菌落周围的显色指示剂产物的扩散区扩散）围绕。因此，使用前侧照明图像，菌落3和4作为单个大菌落出现。然而，背侧照明的图像揭示实际上存在两个分开的菌落，其蓝色区已在板中合并在一起。

[0135] \*\*基于与使用背侧照明的图像测量的菌落直径相比较，使用前侧照明的图像测量的所观察的菌落直径之间的差异来测定菌落类型。

[0136] 在任何情况下，可作出各种修改，而不背离本发明的精神和范围。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以任何次序应用。这些和其他实施例均在所附权利要求书的范围内。

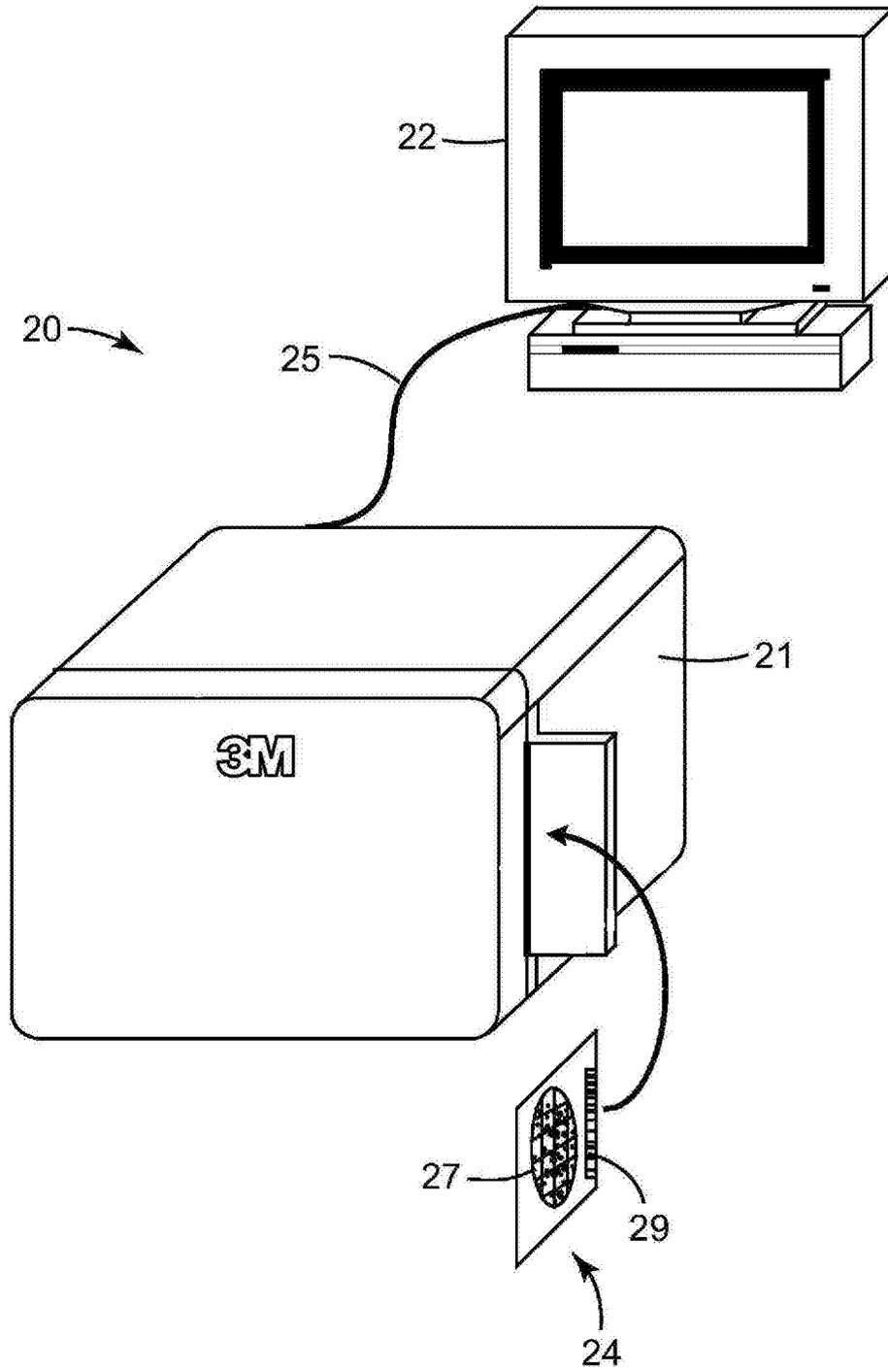


图1

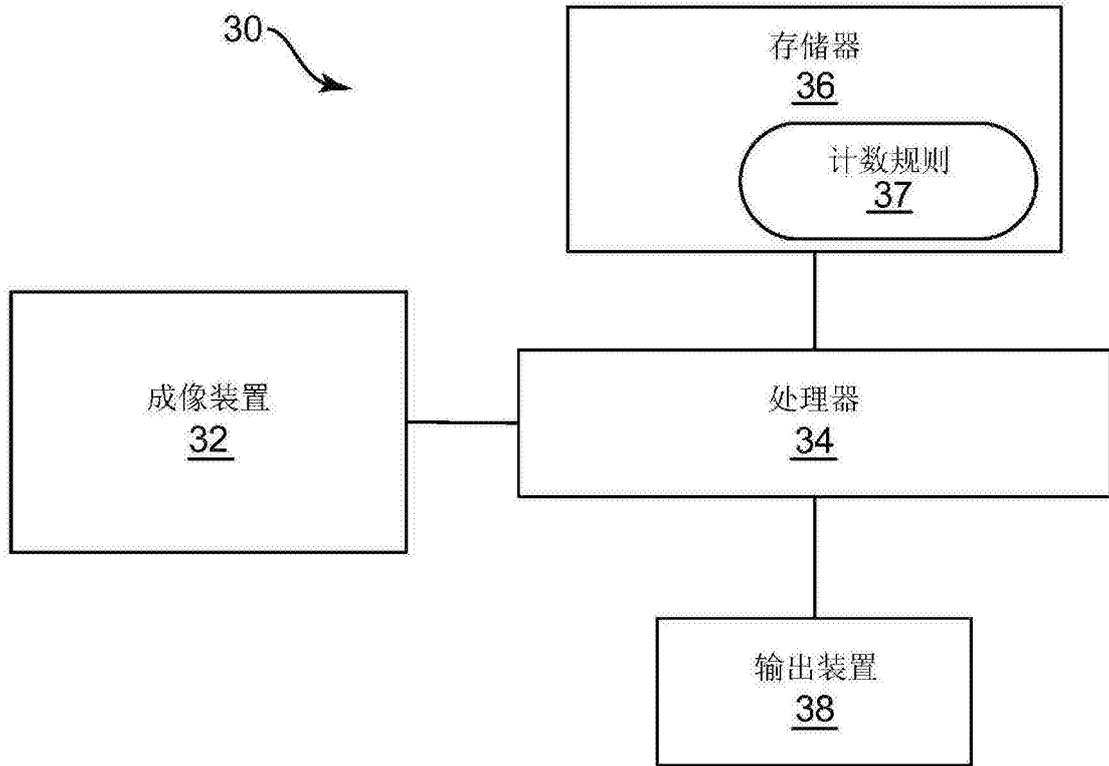


图2

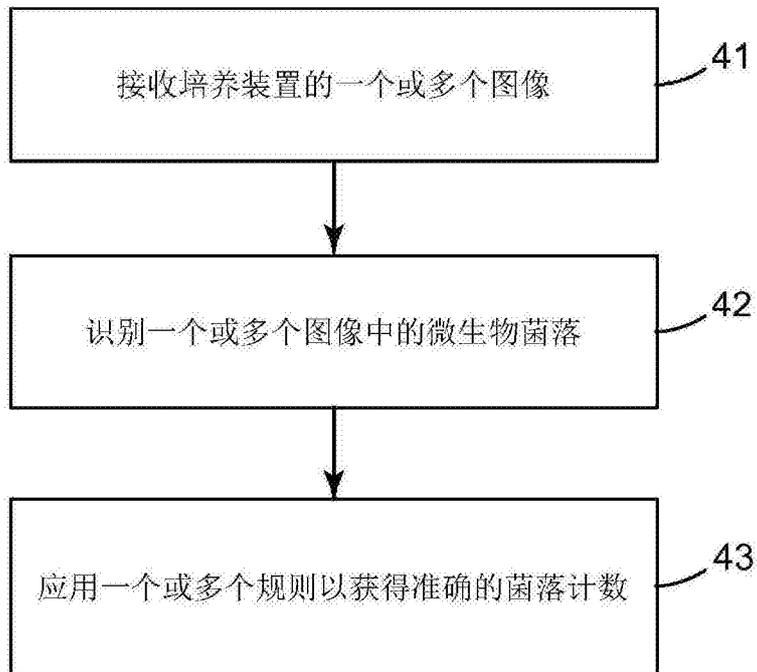


图3

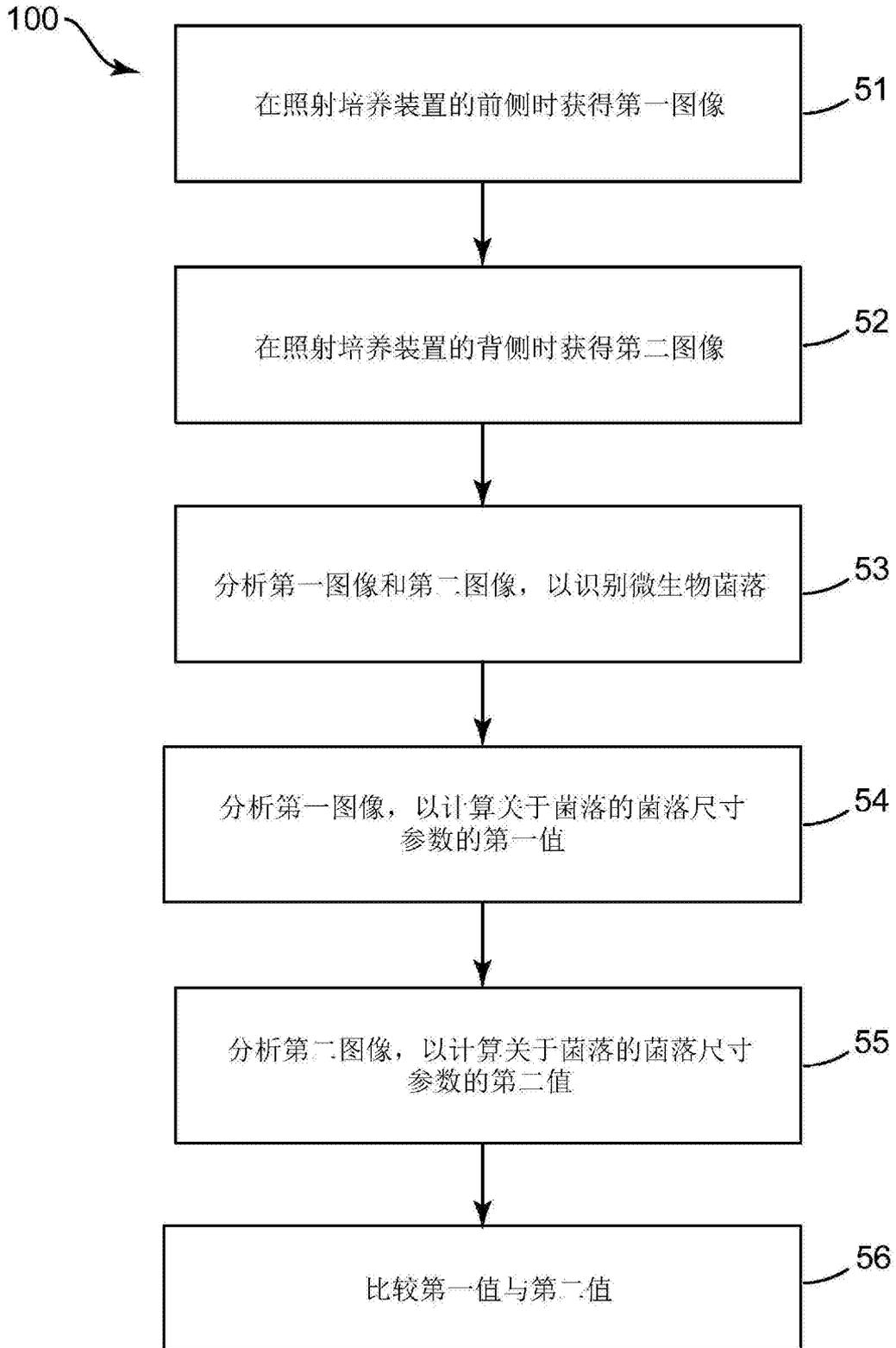


图4

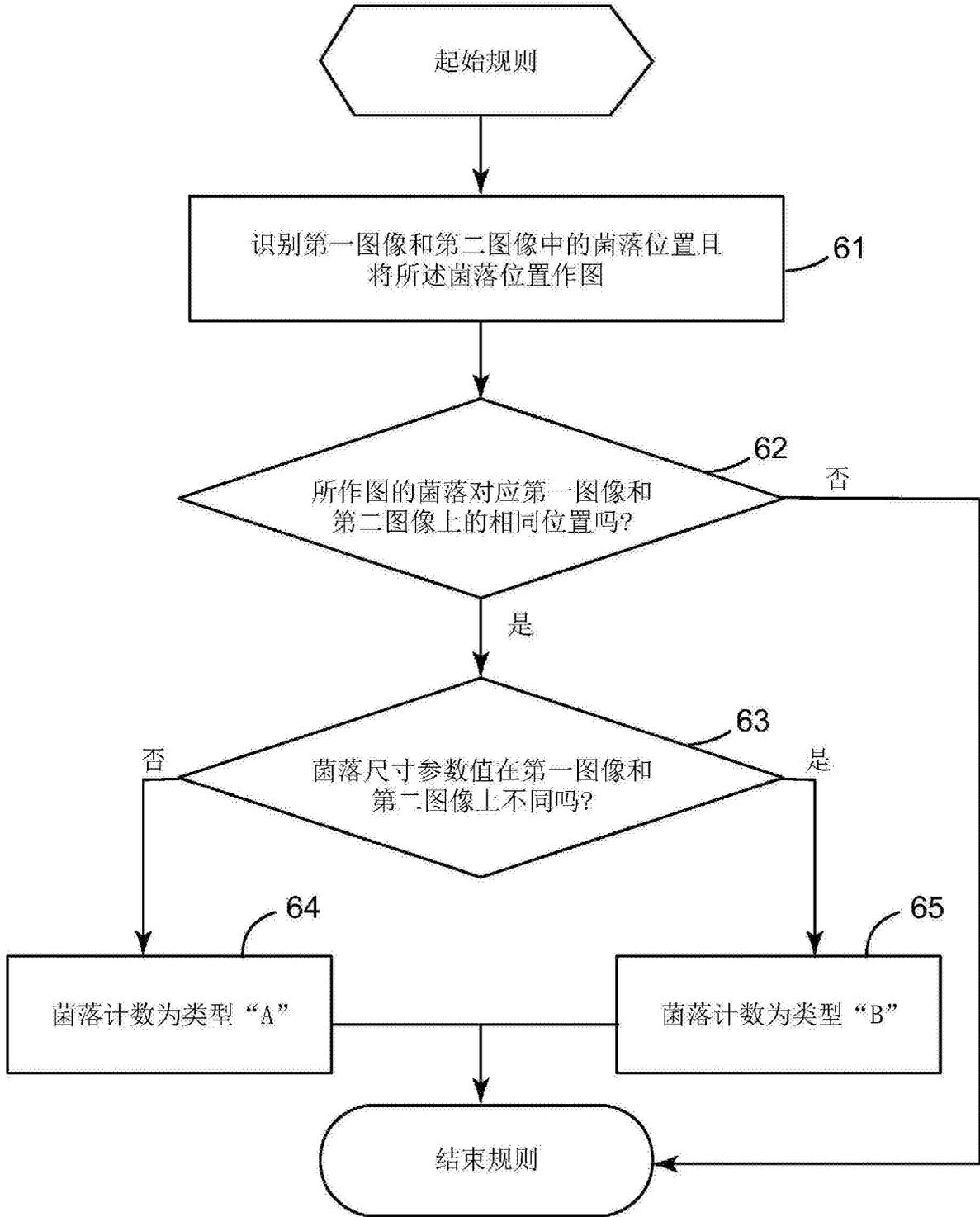


图5

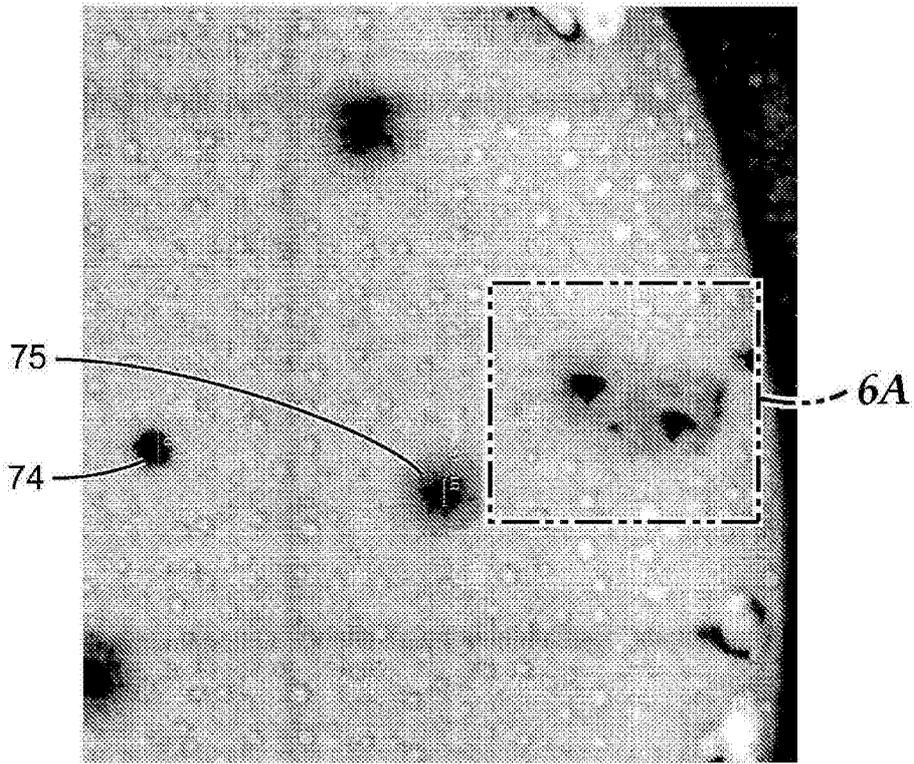


图6

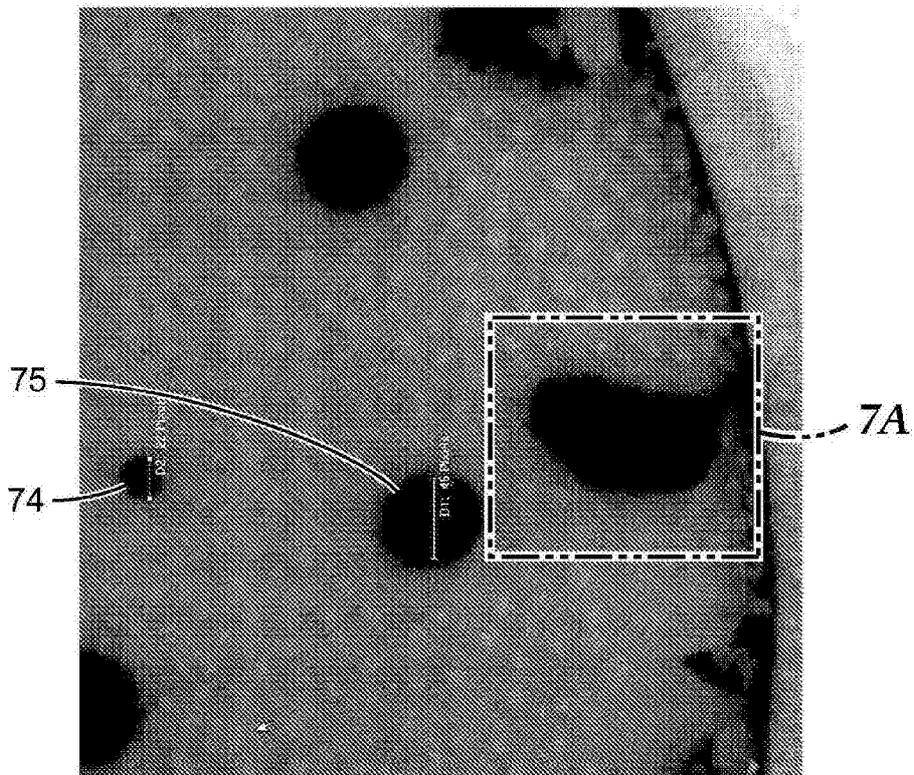


图7

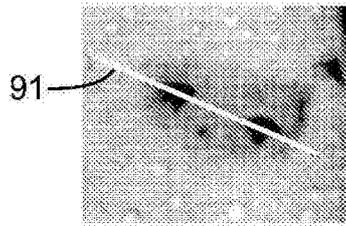


图6A

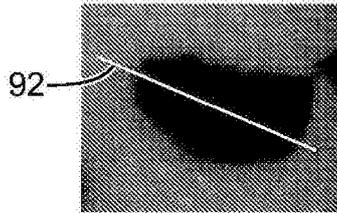


图7A

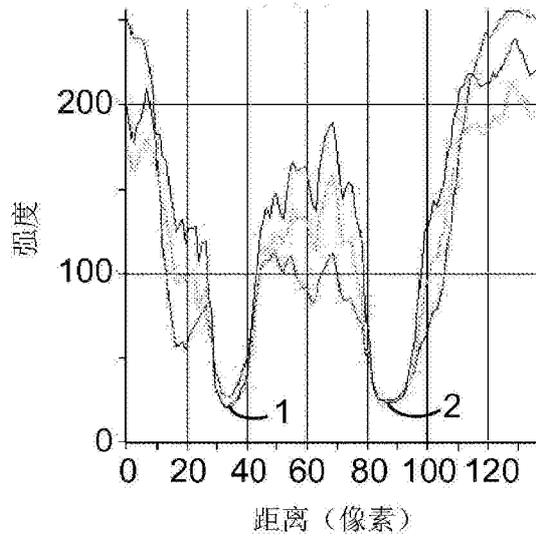


图8

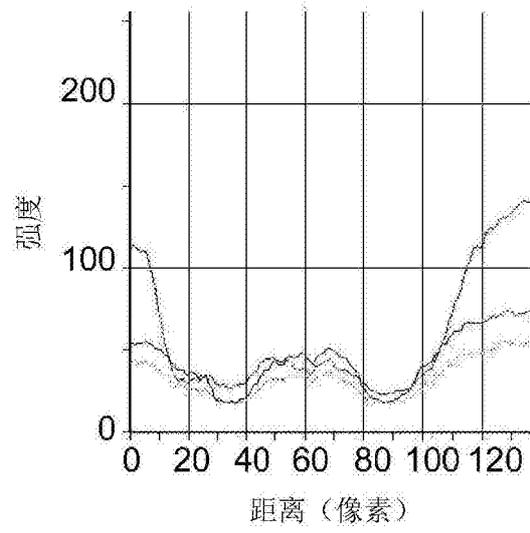


图9