

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 151**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G06T 7/00 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2017 PCT/EP2017/071775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018 WO18041900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2017 E 17758553 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3507378**

54 Título: **Método, sistema y producto del programa informático para determinar la presencia de microorganismos e identificar dichos microorganismos**

30 Prioridad:

02.09.2016 EP 16187153

05.09.2016 EP 16306113

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.05.2021

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy-l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**SUTRA, GUILLAUME;
BARLAS, PHILIPPINE;
ARCHENY, DELPHINE;
DURAND, GÉRALDINE;
FULCHIRON, CORINE;
GORSE, JEAN-FRANÇOIS y
PERRIN, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 823 151 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método, sistema y producto del programa informático para determinar la presencia de microorganismos e identificar dichos microorganismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del análisis microbiológico para analizar muestras biológicas en una placa de Petri, comprendiendo dichas muestras biológicas microorganismos, y más específicamente a un método, sistema y programa informático para determinar la presencia de microorganismos como bacterias e identificar dichos microorganismos dentro la placa de Petri.

Antecedentes de la invención

10 Es bien conocido en el campo de la microbiología que el análisis se realiza sobre el crecimiento de muestras biológicas que comprenden, por ejemplo, microorganismos, extractos celulares o subcelulares, con el fin de determinar la presencia de bacterias específicas e identificar dichas bacterias. Por tanto, se puede diagnosticar una enfermedad correspondiente.

15 En la técnica anterior, existen algunas soluciones para identificar una bacteria. Las soluciones se basan en métodos que comprenden un algoritmo de aprendizaje supervisado que utiliza criterios denominados descriptores. Los descriptores se refieren al color, la forma y la estructura de las bacterias.

Dichos métodos también funcionan con una etapa para determinar la situación de colonias aisladas de bacterias. La situación la puede proporcionar el usuario de forma semiautomática o aplicando un algoritmo de segmentación específico de forma automatizada. Sin embargo, ambos métodos de proporcionar la situación son inexactos y generan algunos errores que conducen a una determinación incorrecta de la situación.

20 La solicitud de patente publicada US 2015/0087017 describe un método para una clasificación automatizada de colonias bacterianas. El método se basa en una etapa de clasificación de colonias bacterianas dentro de una placa de Petri, dicha etapa de clasificación se basa en criterios como el color, la forma y el contorno de cada colonia bacteriana.

25 Sin embargo, este método automatizado no se aplica al análisis del contenido de una placa de Petri. De hecho, el entorno alrededor de las colonias bacterianas en la placa de Petri también debe analizarse para identificar un fenómeno biológico específico relacionado con dichas colonias bacterianas y su interacción con el medio de cultivo. Los biólogos utilizan estas reacciones bioquímicas para distinguir entre diferentes microorganismos y permitir formular o descartar hipótesis de diagnóstico.

30 Por ejemplo, con respecto al análisis del crecimiento de microorganismos en una placa de Petri que contiene medio de cultivo de sangre en agar-agar, los métodos de la técnica anterior incluyen una etapa para identificar la naturaleza del fenómeno de hemólisis para determinar el nivel al que las células sanguíneas en el medio de agar-agar se degradan para caracterizar microorganismos específicos. El fenómeno de la hemólisis se relaciona con la capacidad de determinados microorganismos para producir una proteína capaz de destruir las células sanguíneas del agar-agar. Hay tres tipos de fenómenos de hemólisis, designados por alfa, beta y gamma de la siguiente manera:

- 35 - el fenómeno de la hemólisis alfa produce una decoloración verdosa que rodea a una colonia de bacterias que crece en el sangre en agar-agar. Este tipo de fenómeno de hemólisis representa una descomposición parcial de la hemoglobina de los glóbulos rojos de sangre en agar-agar;
- el fenómeno de hemólisis beta representa una descomposición total de la hemoglobina de los glóbulos rojos en las proximidades de una colonia bacteriana.
- 40 - el fenómeno de hemólisis gamma corresponde a la ausencia de descomposición en el área alrededor de una colonia bacteriana.

45 En otras situaciones, la interacción entre las bacterias y el medio genera artefactos visibles que rodean las colonias, como la aparición de un color específico. Estos cambios de color se deben a reacciones químicas entre el medio de cultivo y los metabolitos producidos por las bacterias, pudiendo interpretarse dichas reacciones químicas como reacciones positivas o negativas según la naturaleza del propio microorganismo. Hoy en día, dicha etapa la proporciona el usuario que tiene que observar el contenido de la placa de Petri para determinar la naturaleza del fenómeno de hemólisis o los cambios de color alrededor de las colonias. Sin embargo, un análisis humano de este tipo puede dar lugar a errores. Además, en la situación en la que hay un mayor número de placas de Petri para analizar, dicha etapa de identificación es un proceso que requiere mucho tiempo.

50 Por tanto, hay necesidad de mejorar los métodos de la técnica anterior para permitir una identificación automatizada de un elemento biológico en una placa de Petri de manera eficaz.

Compendio de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado (tal como al menos una bacteria determinada) en una placa de Petri que comprende una o más colonias de microorganismos y un medio de cultivo, estando adaptado dicho medio de cultivo para permitir que una o más colonias de microorganismos y al menos dicho microorganismo determinado, si está presente, crezca en condiciones de crecimiento adecuadas, comprendiendo el método:

- 5 - obtener, utilizando un sistema de captación de imágenes, al menos una imagen inicial de la placa de Petri, en la que la primera imagen inicial comprende uno o más píxeles visibles, estando cada píxel asociado a un valor de píxel;
- 10 - obtener una primera imagen procesada de la placa de Petri aplicando un primer proceso a al menos una imagen inicial, en donde los píxeles visibles de la primera imagen procesada solo se refieren a los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos;
- 15 - obtener una pluralidad de segundas imágenes procesadas de la placa de Petri aplicando un segundo proceso a la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de la segunda imagen procesada solo se relacionan con los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos y una zona circundante alrededor de dicha una o más colonias de microorganismos;
- 20 - obtener una pluralidad de terceras imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre al menos una imagen inicial y la pluralidad de segundas imágenes procesadas, en donde la pluralidad de terceras imágenes procesadas comprende píxeles visibles que solo se refieren a píxeles asociados al medio de cultivo;
- obtener una pluralidad de cuartas imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre la pluralidad de segundas imágenes procesadas y la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de la pluralidad de cuartas imágenes procesadas solo se refieren a píxeles asociados a la zona circundante;
- 25 - determinar valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y cuarta imágenes procesadas calculando los valores de la diferencia entre los valores promedio de píxeles de la pluralidad de la tercera imagen procesada y los valores promedio de píxeles de la pluralidad de la cuarta imagen procesada para al menos cada canal de color de los canales de color Rojo Verde Azul (RVA);
- determinar un valor de un indicador de la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri clasificando los valores de características determinadas;
- 30 - comparar el valor del indicador con un valor umbral;
- dependiendo del resultado de la comparación, determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri.

En el contexto de la presente solicitud, el término "valores medios de píxeles" se refiere a:

- la media aritmética de los valores de píxeles, o
- 35 - el valor medio de los valores de píxeles.

Según una realización preferida de la invención, los valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y cuarta imágenes procesadas se determinan calculando los valores de diferencia entre los valores de píxeles medianos de la pluralidad de la tercera imagen procesada y los valores de píxeles medianos de la pluralidad de la cuarta imagen procesada para al menos cada canal de color de los canales de color Rojo Verde Azul (RVA).

40 Preferiblemente, el primer proceso es un proceso de segmentación.

El método según la presente invención proporciona un análisis automatizado del contenido de una placa de Petri basado en una identificación automática de una zona específica alrededor de colonias de microorganismos y una determinación automatizada de la presencia de bacterias tales como bacterias hemolíticas beta o Proteus que están asociados respectivamente a un fenómeno biológico como el fenómeno de la hemólisis o la infección por Proteus. Por tanto, el presente método evita la operación de una etapa de identificación visual y/o una etapa de determinación visual.

45 El método según la presente invención comprende una etapa para identificar una zona específica alrededor de colonias de microorganismos en la placa de Petri, donde dicha zona específica puede comprender colonias bacterianas o grupos de colonias bacterianas.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado (tal como al menos una bacteria determinada) en una placa de Petri que comprende una o más colonias de microorganismos y un medio de cultivo, estando adaptado dicho medio de cultivo para permitir que

una o más colonias de microorganismos y al menos dicho microorganismo determinado, si está presente, crezcan en condiciones de crecimiento adecuadas, en donde el sistema comprende un sistema de captación de imágenes para obtener al menos una imagen inicial de la placa de Petri, y un sistema de procesamiento, comprendiendo dicho sistema de procesamiento:

- 5 - una primera unidad de procesamiento para obtener una primera imagen procesada de al menos una imagen inicial de la placa de Petri, en donde los píxeles visibles de la primera imagen procesada solo se refieren a los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos;
- una segunda unidad de procesamiento para obtener una pluralidad de segundas imágenes procesadas de la primera imagen procesada de la placa de Petri, en donde los píxeles visibles de las segundas imágenes procesadas solo se refieren a los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos y una zona circundante alrededor de dicha una o más colonias de microorganismos;
- 10 - una unidad de cálculo para obtener una pluralidad de terceras imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre una segunda imagen inicial y las segundas imágenes procesadas, donde los píxeles visibles de las terceras imágenes procesadas solo se refieren a píxeles asociados al medio de cultivo, y para obtener una pluralidad de cuartas imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre las segundas imágenes procesadas y la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de las cuartas imágenes procesadas solo se refieren a píxeles asociados a la zona circundante;
- 15 - una unidad de extracción de características para determinar valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y la cuarta imágenes procesadas calculando los valores de diferencia entre los valores promedio de píxeles de las terceras imágenes procesadas y los valores promedio de píxeles de las cuartas imágenes procesadas para al menos cada color canal de canales de color RVA;
- 20 - y una unidad de análisis para determinar un valor de un indicador de la presencia del al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri, comparando el valor del indicador con un valor umbral; y determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri, dependiendo del resultado de la comparación.
- 25

Como se indicó anteriormente, según una realización preferida de la invención, los valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y cuarta imágenes procesadas se determinan calculando los valores de diferencia entre los valores de píxel medianos de la pluralidad de la tercera imagen procesada y los valores medianos de píxeles de la pluralidad de la cuarta imagen procesada para al menos cada canal de color de los canales de color Rojo Verde Azul (RVA).

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un producto de programa informático que comprende instrucciones que, cuando se ejecutan, hacen que un aparato de procesamiento de datos programable realice las etapas del método según la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 35 A continuación se hará referencia, a modo de ejemplo, a los dibujos adjuntos, en los que:
 - La figura 1 representa un diagrama simplificado del sistema según una realización de la presente invención;
 - la figura 2 representa un controlador en forma de rueda que comprende un orificio circular, un círculo de fondo blanco y un círculo de fondo negro, según una realización de la presente invención;
 - la figura 3 es un diagrama simplificado del sistema de captación de imágenes, que muestra los diferentes tipos de rayos de iluminación aplicados a una placa de Petri, según una realización de la presente invención;
 - 40 la figura 4 muestra un diagrama de flujo del método para determinar la presencia de bacterias, según una realización de la presente invención;
 - la figura 5 muestra un diagrama de flujo del método para determinar la presencia de bacterias hemolíticas, según una realización de la presente invención;
 - 45 la figura 6 representa la imagen original de la placa de Petri que contiene sangre en agar-agar y bacterias hemolíticas, refiriéndose dicha imagen original a una iluminación a contraluz, según una realización de la presente invención;
 - las figuras 7a, 7b y 7c muestran respectivamente la imagen del canal de color rojo, verde y azul de la imagen original con una vista inferior media, según una realización de la presente intención;
 - la figura 8 muestra una imagen binaria denominada Máscara de Crecimiento de la imagen original según una realización de la presente invención;
 - 50 la figura 9a muestra una imagen relacionada con la Máscara de Halo de la imagen original de la figura 6, según una

realización de la presente invención;

la figura 9b muestra una Máscara de Medio de Cultivo de la imagen original de la figura 6 según una realización de la presente invención;

5 las figuras 10a y 10b muestran respectivamente una Máscara de Halo y una Máscara de Medio de Cultivo para un parche de píxeles de 200 x 200 píxeles con un parámetro de dilatación de 50 píxeles, según una realización de la presente invención;

las figuras 11a, 12a y 13a muestran respectivamente un parche de píxeles de una Máscara de Halo con un parámetro de dilatación de 10 píxeles, 50 píxeles y 60 píxeles, según una realización de la presente invención;

10 las figuras 11b, 12b y 13b muestran respectivamente un parche de píxeles de una Máscara de Medio de Cultivo con un parámetro de dilatación de 10 píxeles, 50 píxeles y 60 píxeles, según una realización de la presente invención;

la figura 14a muestra una distribución de características a nivel de parche en una placa de Petri que comprende bacterias hemolíticas beta, bacterias alfa hemolíticas y bacterias hemolíticas gamma, según una realización de la presente invención;

15 la figura 14b representa un gráfico que muestra la distribución de parches de píxeles con respecto al valor de diferencia de color entre Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo en el canal de color azul, según una realización de la presente invención;

la figura 15 muestra un diagrama de flujo del método para determinar la presencia de bacterias Proteus según una realización de la presente invención;

20 la figura 16a muestra una imagen original de una placa de Petri que comprende un medio de cultivo CPS y bacterias Proteus, según una realización de la presente invención;

la figura 16b muestra una imagen binaria denominada Máscara Binaria de Crecimiento de la imagen original de la figura 16a, según una realización de la presente invención;

la figura 17a muestra una Máscara de Crecimiento coloreada de la imagen original de la figura 16a, según una realización de la presente invención;

25 la figura 17b muestra una Máscara de Halo coloreada de la imagen original de la figura 16a, según una realización de la presente invención;

la figura 17c muestra una Máscara de Medio de Cultivo coloreada de la imagen original de la figura 16a, según una realización de la presente invención;

30 la figura 18a muestra los contornos de Máscara de Halo superpuestos con la vista anular inferior de una placa de Petri que comprende un medio de cultivo CPS y bacterias de clase 4 con un parámetro de dilatación de 70 píxeles, según una realización de la presente invención;

la figura 18b muestra los contornos de Máscara de Halo superpuestos con la vista anular inferior de una placa de Petri que comprende un medio de cultivo CPS y bacterias de clase 4 con un parámetro de dilatación de 10 píxeles, según una realización de la presente invención;

35 la figura 19 muestra un gráfico que representa la distribución de la probabilidad de la presencia de bacterias Proteus, según una realización de la presente invención;

la figura 20 muestra una imagen original de una placa de Petri que contiene un medio de cultivo opaco tal como un CPS opaco con bacterias Proteus, según una realización de la presente invención;

40 las figuras 21 y 22 muestran respectivamente una imagen de la placa de Petri de la figura 20 relacionada con la vista anular inferior izquierda y la vista anular superior, según una realización de la presente invención;

la figura 23 representa un gráfico que muestra la distribución de las probabilidades $p(\text{Halo}/X)$ de la presencia de bacterias Proteus con el algoritmo CART y el algoritmo SVM y la distribución de las probabilidades finales de la presencia de bacterias Proteus para placas de Petri que contienen un medio de cultivo translúcido, según una realización de la presente invención;

45 la figura 24 representa un gráfico que muestra la distribución de las probabilidades $p(\text{Halo}/X)$ de la presencia de bacterias Proteus con el algoritmo CART y el algoritmo SVM y la distribución de las probabilidades finales de presencia de bacterias Proteus para placas de Petri que contienen un medio de cultivo opaco, según una realización de la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La siguiente descripción describe la invención de una manera suficientemente clara y completa, basada en ejemplos específicos. Sin embargo, no debe entenderse que la descripción limita el alcance de la protección a las realizaciones y ejemplos específicos descritos a continuación.

5 En la descripción siguiente, la expresión "placa de Petri" define un conjunto de una placa de Petri y una tapa para cubrir la placa de Petri. La placa de Petri puede comprender una serigrafía que se muestra en la placa de Petri o en la tapa.

En la descripción siguiente, el término "píxel" se refiere a una posición en una imagen y la expresión "valor de píxel" se refiere al valor detectado de la correspondiente intensidad capturada del píxel en dicha imagen.

10 En la descripción siguiente, la expresión "píxel oscuro" se refiere a un píxel que tiene un valor de píxel de 0.

En la descripción siguiente, la expresión "píxel visible" se refiere a un píxel que tiene un valor distinto de 0, también conocido como píxel brillante.

Las operaciones de cálculo descritas se refieren a operaciones asociadas a los valores de píxeles de las imágenes relacionadas.

15 En la descripción siguiente, la representación de la superficie de la placa de Petri tiene lugar en un espacio ortonormal x, y, z donde z es una función de x e y , tal como $z = f(x,y)$.

En la descripción siguiente, los píxeles asociados a la placa de Petri definen una zona en una imagen llamada Máscara de Placa.

20 En la descripción siguiente, los píxeles asociados con el medio de cultivo definen una zona de medio de cultivo en una imagen denominada Máscara de Medio de Cultivo.

De manera similar, los píxeles situados alrededor de las colonias de microorganismos definen una zona circundante o una zona de halo en una imagen denominada Máscara de Halo.

En la descripción siguiente, la expresión "imagen original" se refiere a una imagen de la placa de Petri que se obtiene con un dispositivo de toma de imágenes.

25 En la descripción siguiente, la expresión "imagen inicial" se refiere a una imagen de la placa de Petri, en la que la imagen inicial puede relacionarse con una imagen original o una imagen que se ha procesado dentro de un sistema de captación de imágenes después de ser obtenida con el dispositivo de toma de imágenes.

30 La figura 1 muestra un ejemplo de un sistema 100 según la presente invención. El sistema 100 incluye un banco de recipientes de muestra 102, una máquina automática de rayado 104, un sistema de incubadora inteligente 106, un sistema de procesamiento 108 y una unidad de análisis 110.

El banco de recipientes de muestras 102 produce de forma manual o automática recipientes de muestras en los que se pueden cultivar y analizar muestras biológicas. El recipiente de muestra suele ser una placa de Petri, aunque también se pueden utilizar otros recipientes. Por consiguiente, la referencia a una placa de Petri en la presente memoria no pretende ser limitativa.

35 El banco de recipientes de muestra 102 agrega un medio de cultivo apropiado a la placa de Petri para permitir cultivar la muestra biológica.

40 La máquina de rayado automática 104 aplica una muestra biológica a la placa de Petri y luego distribuye la muestra biológica de una manera conocida. Por ejemplo, en una placa de Petri, la muestra biológica se aplica utilizando un peine que tiene una longitud aproximadamente igual al radio de la placa de Petri. Se aplica el peine y luego se gira para esparcir la muestra biológica sobre la superficie de la placa de Petri. El solicitante comercializa un ejemplo de una máquina de rayado automática 104 adecuada de la marca PREVI® Isola.

Una vez que la muestra biológica se ha distribuido sobre el medio de cultivo en la placa de Petri, la placa de Petri se pasa a la siguiente etapa del proceso, es decir, el sistema de incubadora inteligente 106, manualmente por un operador o por medio de una cinta transportadora u otro sistema automatizado.

45 El sistema de incubadora inteligente 106 incluye una incubadora 112 y un sistema de captación de imágenes 114. La placa de Petri se introduce en el sistema de incubadora inteligente 106 y se incuba durante un tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada. Esto hace que la muestra biológica crezca produciendo una serie de colonias de microorganismos sobre la superficie del medio de cultivo dentro de la placa de Petri. Una vez que la placa de Petri se ha incubado según sea necesario, la placa de Petri se pasa al sistema de captación de imágenes 114. El sistema de captación de imágenes 114 es un sistema para generar imágenes de las colonias y cultivos generados en todo el sistema 100. Los detalles del sistema de captación de imágenes 114 se describirán más adelante.

50

Las imágenes se utilizan en la primera etapa de análisis de las muestras biológicas. Esta etapa puede identificar colonias y otros aspectos de la muestra biológica para ayudar y facilitar más actividades y funciones del sistema 100 en general.

5 Una vez se han producido las imágenes de la placa de Petri, la placa de Petri se pasa a la siguiente etapa del proceso, es decir, el sistema de procesamiento 108. Esto puede llevarse a cabo automáticamente mediante una cinta transportadora u otro sistema automatizado, o por un operador.

10 El sistema de procesamiento 108 puede adoptar una variedad de formas diferentes dependiendo del análisis de muestra biológica requerido. Por ejemplo, se pueden extraer determinadas colonias, basándose en las imágenes, para su posterior análisis o procesamiento. En este momento, se pueden aplicar muchos otros procesos a la placa de Petri. Si es necesario, la placa de Petri puede devolverse al sistema de incubadora inteligente 106 para un mayor crecimiento y/o devolverse al sistema de captación de imágenes 114.

Una vez que se ha completado todo el procesamiento y la captación de imágenes necesarios, la placa de Petri se puede pasar a la unidad de análisis 110 mediante un proceso manual o automático.

15 Como se mencionó anteriormente, el sistema de incubadora inteligente 106 incluye el sistema de captación de imágenes. El sistema de captación de imágenes 114 incluye una unidad base. La unidad base incluye la óptica y los circuitos de control para generar contraluz roja, verde y azul. La unidad base puede incluir un controlador que puede tener la forma de una rueda que tiene tres posiciones como se muestra en la figura 2. Estas posiciones corresponden a diferentes iluminaciones que son "sin Fondo", "Fondo blanco" y "Fondo negro". La posición "sin Fondo" se refiere a un orificio circular 150 en la rueda. La posición "Fondo blanco" se refiere a un círculo 160 de fondo blanco en la rueda. 20 La posición "Fondo negro" se refiere a un círculo 170 de fondo negro en la rueda. No se utiliza ningún fondo para la luz de fondo, mientras que el blanco y el negro se utilizan para todos los demás tipos de iluminación, dependiendo de la naturaleza de la muestra.

25 Sobre la unidad base, hay una unidad de retención de muestras. La unidad de retención de muestras puede incluir un cajón que puede deslizarse hacia adentro y hacia afuera e incluye una cavidad para muestras que está adaptada para soportar una placa de Petri. Además, la unidad de retención de muestras incluye cuatro fuentes de iluminación horizontal roja, verde y azul. Las cuatro fuentes de iluminación están situadas de forma rectilínea alrededor de la cavidad de la muestra y se pueden controlar de forma independiente. En uso, la parte superior de la placa de Petri está sustancialmente en línea con la parte superior de las cuatro fuentes de iluminación horizontal. Las fuentes de iluminación horizontal permiten que la placa de Petri se ilumine con un haz horizontal o casi horizontal.

30 Cabe señalar que la parte inferior de la cavidad de las muestras es ópticamente transmisiva para permitir que la iluminación de fondo ilumine la muestra biológica en uso. La unidad de retención de muestras incluye además la óptica y los controles necesarios para operar las cuatro fuentes de iluminación horizontales.

35 La unidad de retención de muestras puede comprender una orientación alternativa en la que las muestras biológicas se pasan en posición para obtener imágenes mediante una cinta transportadora. El cajón puede ser reemplazado por un sistema de cinta transportadora que tiene zonas de retención de muestras, cada una de las cuales es transparente para permitir la utilización del contraluz. El sistema de cinta transportadora puede mover la muestra biológica a una posición apropiada y luego se pueden tomar las imágenes necesarias. Luego, la cinta transportadora mueve la siguiente muestra biológica a la posición para obtener imágenes y la primera muestra biológica a la siguiente etapa de procesamiento. Esto permite tomar imágenes en diferentes posiciones y cuando la muestra biológica se está 40 moviendo.

45 En otra alternativa, el sistema de captación de imágenes puede incluir un brazo robótico que puede cargar placas de Petri en el portamuestras o en la cinta transportadora. Además, el brazo robótico puede quitar la tapa de la placa de Petri antes de la obtención de imágenes y volver a colocar la tapa después. Esto puede hacerse invirtiendo la placa de Petri y haciendo que la tapa se caiga. Quitar la tapa asegura que la tapa no produzca reflejos cuando la muestra biológica se ilumina con algunas fuentes de iluminación.

50 Además del movimiento dentro y fuera de la zona de captación de imágenes, la unidad de retención de muestras también puede incluir un mecanismo para cambiar la posición de la muestra biológica con respecto a la posición normal. Por ejemplo, la unidad de retención de muestras puede orientar la muestra para que esté en un ángulo específico con respecto a un haz específico. También se pueden realizar otros movimientos, por ejemplo, la rotación, de la muestra biológica con mecanismos apropiados. Como resultado, cualquier movimiento relativo de la muestra biológica y las fuentes de iluminación se puede realizar moviendo la muestra biológica en la unidad de retención de muestras o la fuente de iluminación. Las variaciones son infinitas.

55 El sistema de captación de imágenes 114 incluye además una primera unidad intermedia que está situada encima de la unidad de retención de muestras. La primera unidad intermedia incluye cuatro fuentes de iluminación roja, verde y azul colocadas en forma rectilínea. Las fuentes de iluminación están adaptadas en uso, para producir iluminación anular sobre la cavidad de la muestra en la unidad de retención de la muestra y cada una se puede controlar de forma independiente. La iluminación anular puede ajustarse para que incida sobre la muestra desde cualquier dirección apropiada, incluida la lateral, no lateral o cualquier otra orientación apropiada.

5 El sistema de captación de imágenes 114 también incluye una segunda unidad intermedia. La segunda unidad intermedia incluye cuatro fuentes de iluminación roja, verde y azul colocadas en forma rectilínea. Las fuentes de iluminación están dirigidas hacia arriba y se reflejan desde la unidad superior para dar lugar a una iluminación anular inversa que, en uso, ilumina la muestra en la cavidad de la muestra. Cada fuente de iluminación se puede controlar de forma independiente.

Una unidad principal del sistema de captación de imágenes 114 está situada encima de la segunda unidad intermedia. La unidad principal incluye fuentes de iluminación de luz blanca que se pueden controlar de forma independiente. Las ocho fuentes de iluminación están dispuestas, en uso, para producir iluminación vertical sobre la cavidad de la muestra.

10 La unidad principal también incluye un dispositivo de toma de imágenes 254, tal como una cámara que se dirige hacia la cavidad de la muestra. La iluminación de cualquier combinación de fuentes de iluminación de cualquiera de las unidades puede dirigirse a la cavidad de la muestra. El dispositivo de toma de imágenes puede tomar imágenes de cualquier muestra biológica en la cavidad de muestra que se haya iluminado. El uso y el procesamiento posterior de las imágenes se explicarán con mayor detalle a continuación.

15 La unidad principal también puede incluir un cuadro de mandos que se usa para operar las diversas fuentes de luz. Además de los circuitos de control y la óptica en cada unidad, que controlan su función, puede haber un sistema de control general. El sistema de control general puede incluir un ordenador, una pantalla de visualización, módulos de procesamiento y algoritmos de mejora de imágenes, procesamiento de imágenes y cualquier otro proceso o técnica.

20 El sistema de control general se puede utilizar para controlar qué fuentes de iluminación se utilizan para aplicaciones específicas. Además, el sistema de control general puede aplicar diferentes técnicas de mejora de imágenes y procesamiento de imágenes para diferentes aplicaciones. Las técnicas de mejora de imágenes son métodos y técnicas para mejorar la calidad de la imagen o hacer que la información pertinente sea visible para que la vea un experto. Los ejemplos, descritos con mayor detalle a continuación, incluyen: fusión de diferentes imágenes, como fusión vertical o fusión para hemólisis, corrección de iluminación de bordes, corrección de tiempo de exposición, etc. El procesamiento de imágenes es la extracción de información de imágenes para proporcionar apoyo a la toma de decisiones o decisiones automáticas. Esto no incluye necesariamente una modificación de la imagen, sino una determinación de información/interpretación de nivel superior de forma automatizada. Los ejemplos, que se describen con mayor detalle a continuación, incluyen: detección del anillo del plato, detección de marcas, detección de crecimiento (masas, colonias aisladas, enjambres), decisión global sobre crecimiento/falta de crecimiento, etc.

30 El sistema de control general puede usarse para llevar a cabo cualquier otra función y/u operación de control para el sistema de captación de imágenes. Estos incluyen, pero no se limitan a,

- cargar y descargar la muestra en la cavidad de muestra;
- comprobar y ajustar la colocación de la muestra en la cavidad de muestra;
- controlar el nivel de luminancia;
- controlar el equilibrio de los componentes rojo, verde y azul;
- 35 - controlar el tiempo de exposición;
- controlar combinaciones de iluminación;
- probar el sistema;
- calibrar el sistema; y
- cualquier otro control apropiado basado en el uso y finalidad del análisis.

40 Cada una de las unidades que forman el sistema de captación de imágenes puede moverse respecto a las demás unidades. Cuando esto ocurre, pueden ser necesarios determinados ajustes ópticos para asegurar que la muestra biológica esté iluminada por todas las fuentes.

El funcionamiento del sistema de captación de imágenes 114 se describirá a continuación con más detalle con referencia a la figura 3.

45 La figura 3 muestra un diagrama esquemático del sistema de imágenes 114 para demostrar las diversas fuentes de iluminación y cómo impactan en una muestra biológica situada en el sistema de imágenes 114. La muestra puede ser iluminada por un haz casi horizontal 302, 304 situado en el mismo plano como el plano de la placa de Petri que contiene la muestra biológica. De hecho, el haz casi horizontal incluye componentes que entran y salen del papel además de los ilustrados por las referencias 302 y 304. El haz casi horizontal 302, 304 es producido por las fuentes de iluminación horizontal en la unidad de retención de muestras.

50 La muestra también puede ser iluminada por un haz de luz de fondo 306 generado por la unidad base y debajo de la

placa de Petri para emitir en una dirección vertical desde la parte inferior del sistema de imágenes 114 hacia la parte superior del sistema de imágenes 114.

5 Un rayo anular o rayo anular inferior 308 también puede iluminar la muestra biológica 300 y es producido por la primera unidad intermedia situada encima de la placa de Petri. El haz anular inferior 308 se emite con un ángulo determinado hacia la placa de Petri. Un rayo anular inverso o rayo anular superior 310 producido por la segunda unidad intermedia situada encima de la placa de Petri también puede iluminar la placa de Petri. El haz anular inverso 310 se emite con un ángulo determinado hacia la parte superior del sistema de captación de imágenes 114, lejos de la placa de Petri y luego se refleja hacia la placa de Petri.

10 Un rayo vertical 312 también puede iluminar la placa de Petri y lo generan las fuentes de iluminación en la unidad principal.

15 El rayo vertical y el contraluz aplican iluminación en una dirección sustancialmente perpendicular con respecto a la muestra biológica en la placa de Petri. Por consiguiente, el eje óptico de cada una de estas fuentes de iluminación también es perpendicular a la muestra biológica. Las iluminaciones casi horizontales, anulares o anulares inversas no son perpendiculares a la placa de Petri. Asimismo, por lo tanto, los ejes ópticos de estas fuentes no son perpendiculares a la muestra biológica. Las fuentes no perpendiculares proporcionan una gama diversa o imágenes alternativas a las obtenidas con fuentes perpendiculares. Estas fuentes no perpendiculares proporcionan características ópticas adicionales y diferentes en cualquier imagen creada con ellas. Esto asegura que se mejore el aislamiento y la detección de colonias.

20 Las fuentes de iluminación mostradas en la figura 3 y producidas por la unidad apropiada pueden ser de cualquier tipo preferido, tales como diodos emisores de luz (LED) que operan en las frecuencias roja, verde y azul (RVA); una simple fuente de luz blanca; una fuente de ultravioleta (UV) o cualquier otra fuente de radiación apropiada. Las fuentes de iluminación pueden comprender, por ejemplo, 322 LED que incluyen 64 LED blancos, 86 LED rojos, 86 LED verdes y 86 LED azules. El número de fuentes de luz en cualquier situación puede variar del que se muestra y describe en la presente memoria. La iluminación RVA se proporciona en cada situación mediante un trío de tres LED que funcionan en cada frecuencia respectiva. Para diferentes fuentes de iluminación, puede haber diferentes combinaciones de LED RVA. Cada tipo de iluminación se proporciona mediante tarjetas específicas que comprenden disposiciones específicas de LED. La unidad de base produce el haz de luz de fondo 306 por medio de dos tarjetas, cada una de las cuales incluye una pluralidad de diodos dispuestos de tres en tres. Cada trío de LED 404 incluye un LED rojo, verde y azul. En total, 45 tríos de LED están situados en cada tarjeta y se utilizan para generar el haz de luz de fondo 306. Entre cada trío, los LED rojo, verde y azul pueden iluminarse uno cada vez para producir una iluminación de color tras otra.

30 En todos los casos de la iluminación mencionada anteriormente, la imagen de la muestra biológica es tomada desde arriba por el dispositivo de toma de imágenes 254. Cabe señalar que el dispositivo de toma de imágenes 254 puede tomar un conjunto secuencial de imágenes durante un período de tiempo predeterminado para medir el crecimiento de colonias y otros efectos relacionados con el tiempo. Además, el dispositivo 254 de toma de imágenes puede ser una cámara de vídeo para determinadas aplicaciones en las que se mide la evolución del crecimiento de colonias y similares. El movimiento de la placa de Petri también puede producirse mediante el movimiento de la placa de Petri dentro y fuera del sistema de captación de imágenes 114 por medio de una cinta transportadora adecuada o un brazo robótico.

40 El dispositivo de toma de imágenes 254 está adaptado para tomar diferentes tipos de imágenes de diferentes fuentes de iluminación. Normalmente, se toma una secuencia de imágenes para una aplicación específica. La secuencia comprende las etapas de iluminar la muestra con una iluminación específica o combinaciones de iluminación, seguidas de tomar un tipo específico de imagen, como monocromo, blanco y negro o RVA con la iluminación correspondiente. Luego se toma la imagen siguiente con un tipo diferente de iluminación o una combinación de las mismas y la secuencia continúa hasta que se hayan tomado todas las imágenes requeridas. El dispositivo de toma de imágenes 254 se controla dentro de la secuencia para tomar el tipo apropiado de imagen.

45 Como se mencionó anteriormente, una muestra biológica en el sistema de toma de imágenes 114 se puede iluminar desde una pluralidad de diferentes fuentes de luz, que inciden en la muestra desde diferentes direcciones. Una vez iluminada la muestra biológica, se toma una imagen de la muestra biológica desde arriba. Cada iluminación resalta diferentes aspectos de la muestra biológica.

50 El contraluz muestra detalles de la placa de Petri, incluidas las marcas en la base de la misma, la forma del borde y la tapa de la placa de Petri; y una vista detallada de la distribución y densidad de las colonias en la muestra biológica. Esta iluminación proporciona información que puede aislar colonias, determinar la diferencia entre colonias similares (por ejemplo, especies hemolíticas α y β) y, en general, proporciona una vista del contenido de la muestra.

55 La iluminación casi horizontal es refractada y reflejada por la muestra y su contenido para formar una imagen que puede usarse para aislar y eliminar artefactos. Además, esta imagen se puede utilizar para realizar correcciones basadas en la absorción de iluminación por el medio de cultivo, como se describirá con más detalle a continuación. La imagen también puede usarse después para determinar el porcentaje de cobertura de la placa de Petri por colonias para proporcionar una estimación de la concentración de colonias y para determinar el crecimiento o falta de crecimiento en medios de cultivo no opacos.

- 5 La iluminación anular se dirige hacia la muestra y es reflejada o refractada en el dispositivo de toma de imágenes 254 por el medio de cultivo y las colonias que se hayan formado. El propósito de la imagen producida por esta iluminación es la capacidad de distinguir los colores del medio de cultivo y las colonias. La capacidad de identificar el color es a menudo una herramienta importante para identificar microorganismos específicos, ya que algunos tienen colores muy característicos. El resultado general es una vista que es la más parecida a la que un biólogo esperaría ver para un tipo específico de microorganismo, por ejemplo, colores, aspectos de colonias, etc. Esto es particularmente importante para identificar los cambios sutiles en la coloración en el medio de cultivo y alrededor de las colonias. Además, las imágenes producidas por iluminación anular permiten la detección de variaciones sutiles de colores debajo y alrededor de las colonias bacterianas en medios cromógenos.
- 10 La iluminación anular lateral es una iluminación de solo una de las cuatro fuentes colocadas en línea recta. Esto da una imagen con sombras que se pueden utilizar para identificar contornos y relieve. Cada una de las fuentes dará lugar a diferentes efectos de sombra como resultado de la dirección de iluminación.
- 15 La iluminación anular inversa se refleja desde la unidad principal sobre la muestra. A continuación, la muestra refleja o refracta la iluminación en el dispositivo de toma de imágenes 254. La imagen así tomada da detalles del contraste de las diferentes colonias en la muestra. Esta imagen también puede aportar información sobre el color. Además, esta imagen puede proporcionar información sobre la textura; aspecto y color de las colonias; información sobre límites de la conglomeración y cierta información sobre el relieve de las colonias, como elevación, forma y estado.
- 20 La iluminación anular inversa produce una iluminación casi vertical que permite la visualización de cambios de gradiente. Esto proporciona información de textura y granularidad y es útil para detectar colonias que no tienen mucha elevación pero que tienen irregularidades en la superficie. En una realización, se toman varias imágenes diferentes usando la iluminación anular inversa y posteriormente se combinan para hacer frente a la posibilidad de saturación de la imagen.
- 25 La fuente de iluminación vertical ilumina la muestra biológica desde arriba. La iluminación es reflejada por la muestra biológica y las colonias para dar una imagen que proporciona información detallada del contorno. Esto se puede utilizar para identificar el relieve de la muestra biológica y la altura de las colonias. Esta información se puede utilizar para identificar tipos específicos de microorganismos, ya que el relieve de una colonia suele ser muy específico. Por ejemplo, determinadas colonias tienen forma de cúpula, otras tienen protuberancias, otras son planas, etc.
- 30 Como se describió anteriormente, cada una de las fuentes y direcciones de iluminación pueden utilizarse para acentuar y mejorar diferentes características de la imagen. Los ejemplos descritos pueden cambiarse o adaptarse utilizando iluminación de diferentes fuentes y direcciones sin apartarse del alcance de la presente invención.
- Además, se pueden utilizar diferentes longitudes de onda de iluminación para diferentes aplicaciones, por ejemplo, infrarrojo y ultravioleta.
- 35 El sistema de captación de imágenes 114 puede crear imágenes a partir de una combinación de fuentes de iluminación para generar una imagen compuesta que puede acentuar y mejorar más de una característica de la imagen de la muestra biológica.
- Otro factor que puede influir en la imagen generada es el tipo de medio de cultivo utilizado para hacer crecer la muestra. Existen muchos medios de cultivo diferentes; estos incluyen CPS, que es un medio de cultivo especialmente adaptado para identificar *E-coli*, *Proteus* y KESC usando una muestra de orina; y COS, que es un medio de cultivo que incluye sangre, que es útil para identificar la capacidad hemolítica.
- 40 Los diferentes medios de cultivo, como CPS y COS, son bastante diferentes en naturaleza y color. Como resultado, la iluminación que actúa sobre los mismos puede producir diferentes tipos de imagen. Como tal, se pueden usar diferentes fuentes de iluminación y combinaciones de fuentes para diferentes medios de cultivo.
- 45 Como se mencionó anteriormente, el sistema 100 comprende un sistema de procesamiento 108 y una unidad de análisis 110. El sistema de procesamiento 108 comprende una primera unidad de procesamiento 116, una segunda unidad de procesamiento 118, una unidad de cálculo 120 y una unidad de extracción de características 122.
- 50 La primera unidad de procesamiento 116 puede operar un primer proceso, que es un proceso de segmentación aplicado a una imagen original de la placa de Petri tal como contraluz o vista anular inferior y proporcionada por el sistema de toma de imágenes 114, para obtener una imagen binaria que muestra una línea visible de separación entre el contenido de la placa de Petri asociado a las colonias de microorganismos y el contenido de la placa de Petri asociado al medio de cultivo. Por tanto, la primera unidad de procesamiento 116 proporciona una primera imagen procesada que es una imagen binaria denominada Máscara de Crecimiento que comprende píxeles visibles que solo se refieren a píxeles asociados a las colonias de microorganismos.
- 55 La primera unidad de procesamiento 116 también puede operar otros procesos que comprenden un proceso de detección de bordes bien conocido para localizar el contenido de la placa de Petri con respecto al borde de la placa de Petri y un proceso de combinación bien conocido para combinar dos imágenes originales en un proceso bien conocido para eliminar el ruido de la imagen.

La segunda unidad de procesamiento 118 puede operar un segundo proceso que es un proceso de dilatación que se aplica a la Máscara de Crecimiento para obtener una segunda imagen procesada denominada (Máscara de Crecimiento) Dilatada. La (Máscara de Crecimiento) Dilatada comprende píxeles visibles que solo se relacionan con píxeles asociados a las colonias de microorganismos y también con píxeles asociados a una zona circundante alrededor de las colonias de microorganismos. El parámetro de dilatación se define para que (Máscara de Crecimiento) Dilatada abarque la zona circundante. El parámetro de dilatación lo determina el usuario como se describe a continuación. La zona circundante puede relacionarse con una zona que muestra otro color en comparación con el color de los microorganismos en la misma imagen. La zona circundante también puede referirse a una zona que muestra una decoloración del color de los microorganismos o a una zona que muestra una nueva pigmentación en comparación con el color de los microorganismos en la misma imagen.

La unidad de cálculo 120 es capaz de operar un tercer proceso relacionado con un cálculo de diferencia entre dos imágenes para obtener una imagen resultante. Por tanto, la unidad de cálculo 120 es capaz de calcular la diferencia entre la imagen original de la placa de Petri, es decir, la Máscara de Placa, y la Máscara de Crecimiento para proporcionar una tercera imagen procesada denominada Máscara de Medio de Cultivo. Máscara de Medio de Cultivo comprende píxeles visibles que solo se relacionan con los píxeles asociados con el medio de cultivo.

La unidad de cálculo 120 también es capaz de operar un cuarto proceso relacionado con un cálculo de diferencia entre la (Máscara de Crecimiento) Dilatada y la Máscara de Crecimiento para proporcionar una cuarta imagen procesada denominada Máscara de Halo. La Máscara de Halo comprende píxeles visibles que solo se relacionan con la zona circundante.

La unidad de extracción de características 122 es capaz de operar un proceso de extracción de características para determinar los valores de características de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo. Los valores de las características se relacionan con los valores de píxeles de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo. La unidad de extracción de características 122 calcula la diferencia entre los valores de píxel promedio de la tercera imagen procesada y los valores de píxel promedio de la cuarta imagen procesada para al menos los tres canales de color Rojo Verde Azul (RVA). Como se indicó anteriormente, la expresión "valores promedio de píxeles" se refiere a la media aritmética de los valores de los píxeles o al valor medio de los valores de los píxeles.

La unidad de análisis 110 es capaz de operar un proceso de análisis basado en los valores de características determinados para determinar la presencia de bacterias e identificar dichas bacterias. Más específicamente, la unidad de análisis 110 determina el valor de un indicador para comparar el valor de dicho indicador con un valor umbral determinado. Dependiendo del resultado de la comparación, la unidad de análisis 110 determina la presencia de bacterias o la ausencia de bacterias dentro de la placa de Petri.

Según la presente invención, como se muestra en la figura 4, el método comprende una etapa 400 para obtener una imagen original de la placa de Petri, con el sistema de captación de imágenes 114, según condiciones de iluminación específicas. De hecho, las condiciones de iluminación pueden variar según el tipo de bacteria a identificar. La imagen original puede procesarse para detectar el borde de la placa de Petri, por ejemplo.

El método comprende entonces una etapa 402 para obtener una primera imagen procesada aplicando el primer proceso, que es un proceso de segmentación, sobre la imagen original para obtener una primera imagen denominada Máscara de Crecimiento. Entonces, el método comprende una etapa 404 para obtener una segunda imagen procesada aplicando el segundo proceso, que es un proceso de dilatación, sobre la primera imagen procesada para obtener una segunda imagen denominada (Máscara de Crecimiento) Dilatada. El método comprende otra etapa 406 para obtener una tercera imagen procesada aplicando el tercer proceso para obtener una tercera imagen denominada Máscara de Medio de Cultivo. El método también comprende una etapa 408 para obtener una cuarta imagen procesada aplicando el cuarto proceso para obtener una cuarta imagen denominada Máscara de Halo. El método comprende además una etapa 410 para determinar valores de características asociados a la tercera imagen procesada y la cuarta imagen procesada para determinar la diferencia de color entre la tercera y la cuarta imagen procesada. El método también comprende una etapa 412 para determinar el valor de un indicador clasificando los valores de las características. El valor del indicador se compara luego con un valor umbral en una etapa 414. El método comprende una etapa final 416 para determinar la presencia de bacterias e identificar dichas bacterias en la placa de Petri como las bacterias determinadas.

En una primera realización de la presente invención, el método se refiere a la determinación de la presencia de bacterias hemolíticas beta para identificar el fenómeno de hemólisis. El método de la primera realización comprende las etapas siguientes, como se muestra en la figura 5.

En la primera realización, Máscara de Halo se refiere a una zona del halo que muestra una zona decolorada o descolorida alrededor de las colonias de microorganismos que es una característica del fenómeno de hemólisis. La zona de decoloración surge del color de los microorganismos en la misma imagen. El medio de cultivo es sangre en agar-agar.

En la primera realización, el método comprende una etapa 500 para obtener una imagen inicial hecha de la combinación de las imágenes mostradas en las figuras 7a, 7b y 7c. La imagen inicial se obtiene utilizando la vista

anular inferior mediana para los canales de color RVA con el sistema de captación de imágenes 114. De hecho, el fenómeno de hemólisis es menos visible en las imágenes tomadas con esta vista, específicamente en los canales de color verde y azul. La figura 7a muestra una imagen original del canal de color rojo. La figura 7b muestra la imagen original del canal de color verde y la figura 7c muestra la imagen original del canal de color azul.

5 El método comprende entonces una etapa 502 para determinar el borde de la placa de Petri con un método de detección del borde bien conocido y una etapa para eliminar el ruido de la imagen con el filtro gaussiano bien conocido, donde $\sigma = 1$ y $k = 5 \times 5$.

10 El método comprende entonces una etapa 504 para separar cada canal de color y una etapa 506 para combinar las imágenes de los canales de color verde y azul con los valores promedio de píxeles para ambas imágenes para proporcionar una imagen promedio. De hecho, la eliminación de la imagen del canal de color rojo evita considerar la zona del halo como colonias de microorganismos.

15 El método comprende además un proceso de segmentación que comprende la etapa siguiente. El proceso de segmentación comprende la determinación de un valor umbral en la etapa 508 según el bien conocido método Otsu basado en la imagen combinada de la imagen del canal de color verde y la imagen del canal de color azul. De hecho, el método Otsu proporciona un valor de umbral denominado umbral (Otsu) para comparar el valor medio del valor de píxel en una posición (x,y) en determinadas imágenes. Más específicamente, el método Otsu proporciona un valor de umbral que minimiza la relación referida a la variancia intraclase y la variancia entre clases donde los valores de píxeles brillantes se refieren a la primera clase y los valores de píxeles oscuros se refieren a la segunda clase. En la situación actual, los píxeles brillantes se refieren a las colonias de microorganismos y los píxeles oscuros se refieren al medio de cultivo.

20 El método comprende entonces una etapa 510 para segmentar la imagen anular inferior mediana aplicando la siguiente fórmula de segmentación (1):

$$(1) \quad I_s(x,y) = \begin{cases} 1, & \overline{I(x,y)} > \text{umbral (Otsu)} \\ 0, & \overline{I(x,y)} \leq \text{umbral (Otsu)} \end{cases}$$

donde

$$25 \quad \overline{I(x,y)}$$

es el valor promedio de un mismo píxel en una posición (x,y) en una misma imagen para los canales de color verde y azul.

La aplicación del método Otsu proporciona una imagen binaria.

30 El método también comprende una etapa opcional 512 para aplicar una operación morfológica basada en un conocido operador de cierre en la imagen binaria para obtener una imagen binaria denominada Máscara de Crecimiento como se muestra en la figura 8.

35 El método según la primera realización comprende entonces otra etapa 514 para obtener una segunda imagen original mostrada en la figura 6, usando la vista a contraluz con el sistema de captación de imágenes 114. De hecho, el fenómeno de hemólisis es más visible en imágenes tomadas con esta vista en la que la zona relacionada con el medio de cultivo es roja, la zona de decoloración es transparente con un color blanco o amarillo o un color compuesto de amarillo y blanco, y la zona relacionada con los microorganismos es oscura, tal como el color negro.

40 El método comprende una etapa 516 para aplicar una operación de dilatación bien conocida en la Máscara de Crecimiento, estando basada dicha operación de dilatación en un elemento estructurante tal como un elemento en forma de disco. La operación de dilatación se opera con una función conocida como la función matlab imdilate y con un parámetro de dilatación específico d para obtener una imagen dilatada correspondiente de la Máscara de Crecimiento denominada (Máscara de Crecimiento) Dilatada.

El Máscara de Halo que se muestra en la figura 9a y el Máscara de Medio de Cultivo que se muestra en la figura 9b se pueden deducir del (Máscara de Crecimiento) Dilatada como se indica a continuación:

$$\text{Máscara de Halo} = (\text{Máscara de Crecimiento}) \text{ Dilatada} - \text{Máscara de Crecimiento}$$

45 en el que las colonias de microorganismos que se muestran en la Máscara de Crecimiento se eliminan de la (Máscara de Crecimiento) Dilatada para proporcionar la Máscara de Halo.

$$\text{Máscara de Medio de Cultivo} = \text{Máscara de Placa} - (\text{Máscara de Crecimiento}) \text{ Dilatada}$$

en donde las colonias de microorganismos y la zona de halo referida al fenómeno de hemólisis se eliminan del Máscara de Placa para proporcionar Máscara de Medio de Cultivo.

Máscara de Halo muestra el color alrededor de las colonias de microorganismos.

Máscara de Medio de Cultivo muestra el color original del medio de cultivo, es decir, el color que no ha sido afectado por el crecimiento de microorganismos.

5 En la etapa siguiente 518, Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo se dividen cada una en parches de píxeles. La figura 10a muestra un parche de píxeles de Máscara de Halo y la figura 10b muestra un parche de píxeles de Máscara de Medio de Cultivo. En las figuras 10a y 10b, cada parche de píxeles comprende 200 x 200 píxeles y el tamaño de la dilatación es de 50 píxeles. El tamaño del parche de píxeles se adapta para detectar valores medianos correspondientes.

10 La división de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo se procesa con una tasa de superposición del 50% entre dos parches de píxeles adyacentes para Máscara de Halo y dos parches de píxeles adyacentes para Máscara de Medio de Cultivo. Por tanto, se optimiza el número de parches de píxeles que comprenden tanto píxeles de halo como píxeles de medio de cultivo.

15 Además, se establece un criterio para los parches de píxeles relacionados con Máscara de Halo. Los parches de píxeles en los que la zona de halo comprende un área que contiene menos de 100 píxeles no se consideran para las etapas siguientes del método.

En otra etapa 520, se calculan los valores medios de píxeles de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo para cada parche de píxeles, para cada canal del espacio de color RVA y para la representación en escala de grises.

El cálculo de la diferencia de los valores de píxeles medios estadísticos para Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo se procesa varias veces basándose en valores crecientes del parámetro de dilatación d.

20 La determinación del parámetro de dilatación d que se seleccionará para las etapas siguientes se procesa a continuación en ella etapa 522.

25 La determinación del parámetro de dilatación d se basa en la siguiente fórmula para determinar el valor del parámetro de dilatación d que maximiza el valor de diferencia entre los valores de píxeles de Máscara de Halo y los valores de píxeles de Máscara de Medio de Cultivo. La fórmula de dilatación (2) a continuación se aplica para cada canal de color RVA y la representación en escala de grises:

$$(2) \textit{ dilatación max} = \underset{\textit{para } d \in [10; 60]}{\operatorname{argmax}} | \textit{Media}(\textit{Máscara de Halo } d) - \textit{Media}(\textit{Máscara de Medio de Cultivo } d) |$$

Los valores crecientes del parámetro de dilatación se seleccionan en un intervalo de 10 píxeles a 60 píxeles, con una etapa de 10 píxeles para dos valores consecutivos de d.

30 La etapa 522 proporciona una pluralidad de imágenes binarias denominadas (Máscara de Crecimiento) Dilatada y por lo tanto una pluralidad de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo.

Las figuras 11a, 12a y 13a muestran respectivamente un ejemplo de una Máscara de Halo con diferentes valores del parámetro de dilatación d en donde d = 10 píxeles en la figura 11a, d = 50 píxeles en la figura 12a y d = 60 píxeles en la figura 13a.

35 Las figuras 11b, 12b y 13b, respectivamente, muestran un ejemplo de Máscara de Medio de Cultivo con diferentes valores del parámetro de dilatación d en donde d = 10 píxeles en la figura 11b, d = 50 píxeles en la figura 12b y d = 60 píxeles en la figura 13b.

En la situación actual, el parámetro de dilatación determinado es d = 50 píxeles.

40 En función del parámetro de dilatación determinado, la diferencia de los valores de píxel medios para un mismo canal entre Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo se calcula en la etapa 524 aplicando la siguiente fórmula de características (3) que proporciona cuatro valores de diferencia entre los valores medios para el canal de color RVA y valores medios para la representación en escala de grises:

$$(3) \textit{ Parche de características} = \textit{Media}(\textit{Máscara de Halo}) - \textit{Media}(\textit{Máscara de medio de Cultivo})$$

45 En una etapa adicional 526, la unidad de análisis 110 opera una etapa para clasificar los valores del parche de características según una regla determinada que establece un valor umbral calculado con la fórmula de esperanza (4) a continuación:

$$(4) \textit{ Esperanza} = \begin{cases} \textit{Beta}, & \exists \textit{ Parche de características} > \textit{umbral} \\ \textit{Sin Beta}, & \textit{de otra manera} \end{cases}$$

Donde el parche de características es el valor de la diferencia de los valores de píxel medio entre Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo en el canal azul.

5 Las figuras 14a muestran imágenes de una placa de Petri relacionadas respectivamente con bacterias hemolíticas beta, bacterias hemolíticas alfa y bacterias hemolíticas gamma con la representación de los valores de las características a nivel de parche en el canal azul.

El conjunto de valores relacionados con la fórmula de esperanza representa la distribución de los parches de hemólisis de Beta y los parches de hemólisis de Sin Beta en los que los parches de hemólisis Beta comprenden una zona de halo representativa del fenómeno de hemólisis y los parches de hemólisis de Sin Beta no comprenden una zona de halo representativa del fenómeno de hemólisis.

10 En la etapa 528, la distribución de parches de hemólisis de Sin Beta se compara con una distribución gaussiana basada en la media μ y la desviación típica σ como se muestra en la figura 14b.

Se establece un valor de umbral que se muestra en la figura 14b y se basa en la regla 3σ (5) a continuación para determinar una distribución normal como se indica a continuación:

$$(5) \quad P(\mu - 3\sigma \leq x \leq \mu + 3\sigma) \approx 0,9973$$

15 Esto significa que el valor umbral es igual a $\mu + 3\sigma$.

En la etapa 530, la unidad de análisis 110 determina la presencia o ausencia de bacterias hemolíticas beta. Si los valores del parche de características son valores positivos altos, estos valores indican la presencia de bacterias hemolíticas beta.

20 Si los valores del parche de características son negativos o próximos a 0, estos valores indican otro fenómeno, como la presencia de bacterias hemolíticas alfa o hemolíticas gamma.

En otra realización específica, el uso de parches de píxeles proporciona un método para determinar la presencia del fenómeno de hemólisis de una manera local, es decir, en una zona específica de la imagen de la placa de Petri.

Según una segunda realización de la presente invención relacionada con la determinación de la presencia de bacterias Proteus, el método comprende las etapas siguientes mostradas en la figura 15.

25 En la segunda realización, Máscara de Halo se refiere a una zona de halo que presenta una zona de pigmentación alrededor de las colonias de microorganismos en la que el color de la zona de pigmentación lo produce la presencia de los microorganismos en la misma imagen. El medio de cultivo se refiere a un medio de cultivo cromógeno como CPS.

30 En la segunda realización, el método comprende una etapa 1500 para obtener dos vistas originales de la placa de Petri utilizando la vista sin Fondo a contraluz y la vista media del Fondo negro anular de fondo. La imagen de vista media del Fondo negro anular de fondo es la imagen media de las cuatro imágenes de la vista lateral anular de fondo.

La figura 16a muestra una imagen original de la placa de Petri utilizando la vista sin Fondo a contraluz. En realidad, la figura 16a muestra una zona oscura relacionada con la presencia de colonias de microorganismos y la zona de pigmentación se refiere a una zona que tiene un color marrón alrededor de la zona oscura.

35 El método comprende a continuación una etapa para determinar el borde de la placa de Petri con un método de detección de bordes bien conocido.

El método comprende además una etapa 1502 para aplicar un proceso de segmentación de regiones basado en gráficos específicos que se describe en la referencia bibliográfica [1].

40 El proceso de segmentación de regiones basado en gráficos proporciona una imagen que comprende una primera región denominada fondo que se relaciona con la zona del medio de cultivo y una segunda región denominada primer plano que se relaciona con el resto de la placa de Petri y también comprende una zona serigráfica relacionada con la serigrafía.

45 Dicho proceso de segmentación segmenta tanto los grupos de colonias de microorganismos como las colonias aisladas de microorganismos dentro de la misma máscara, es decir, dentro de la misma región de primer plano. Además, la segmentación de regiones basado en gráficos se adapta a un ligero cambio de color de la zona del medio de cultivo, como en la situación actual con la presencia del halo de Proteus.

El proceso de segmentación también comprende una etapa para detectar la zona de serigrafía con un algoritmo de detección bien conocido.

El proceso de segmentación proporciona a continuación una imagen binaria denominada Máscara de Crecimiento como se muestra en la figura 16b.

El método comprende una etapa más 1504 para aplicar una operación de dilatación a la Máscara de Crecimiento, dicha operación de dilatación se basa en un elemento estructurante tal como un elemento en forma de disco. La operación de dilatación es operada por una función bien conocida como la función imdilate de matlab para producir una (Máscara de Crecimiento) Dilatada.

- 5 Máscara de Halo se refiere a la zona que puede comprender la zona de pigmentación alrededor de las colonias de microorganismos, siendo dicha zona de pigmentación representativa de la presencia de bacterias Proteus. Máscara de Medio de Cultivo muestra el color original del medio de cultivo, es decir, el color que no ha sido afectado por la zona de pigmentación.

10 La Máscara de Halo que se muestra en la figura 17b y la Máscara de Medio de Cultivo que se muestra en la figura 17c se pueden deducir de la (Máscara de Crecimiento) Dilatada y la Máscara de Placa se refiere a la imagen original que se muestra en la figura 16a como se indica en las fórmulas (6) y (7) a continuación:

(6) Máscara de Halo = (Máscara de Crecimiento) Dilatada - Máscara de Crecimiento – Máscara de Serigrafía

(7) Máscara de Medio de Cultivo = Máscara de Placa - (Máscara de Crecimiento) Dilatada – Máscara de Serigrafía

15 La operación de dilatación se aplica varias veces basándose en valores crecientes del parámetro de dilatación d. Los valores crecientes del parámetro de dilatación d se seleccionan en un intervalo de 10 píxeles a 70 píxeles, con una etapa de 10 píxeles para dos valores consecutivos de d. La etapa 1504 proporciona una pluralidad de imágenes denominadas (Máscara de Crecimiento) Dilatada.

La figura 18a muestra un ejemplo de Máscara de Halo donde el parámetro de dilatación d = 70 píxeles.

La figura 18b muestra un ejemplo de Máscara de Halo donde el parámetro de dilatación d = 10 píxeles.

20 En las etapas siguientes, la unidad de extracción de características 120 determina las características de Máscara de Halo y Máscara de Medio de Cultivo. Por lo tanto, la unidad de extracción de características 120 extrae las características de color.

25 El método comprende una etapa (no mostrada) para calcular el valor medio estadístico de los valores de los píxeles para el espacio de color RVA y el espacio CSV (Color, Saturación, Valor). En el espacio CSV, el valor H se reemplaza por el vector (cos H, sen H) para evitar la discontinuidad de la escala Color donde 0 y 1 corresponden al mismo valor Color. Por tanto, el espacio CSV comprende cuatro canales.

Para calcular el valor medio estadístico, se seleccionan dos imágenes diferentes. La primera imagen se refiere a la vista sin Fondo a contraluz y la segunda imagen se refiere a la vista Fondo negro anular de fondo media. La imagen de la vista Fondo negro anular de fondo media es la imagen media de las cuatro imágenes de la vista lateral de fondo.

30 El método comprende una etapa 1506 para operar la siguiente fórmula de características (8), para cada canal de color RVA y cada canal del espacio CSV:

Característica = $|Media(Máscara\ de\ Halo) - Media(Máscara\ de\ Medio\ de\ Cultivo)|$

Para el espacio de color RVA, hay 3 canales de color RVA donde se aplican 7 operaciones de dilatación en 2 imágenes diferentes. Por lo tanto, se extraen un total de 42 características al aplicar la fórmula anterior.

35 Para el espacio CSV, hay 4 canales donde se aplican 7 operaciones de dilatación en 2 imágenes diferentes. Por lo tanto, se extraen un total de 56 características al aplicar la fórmula anterior.

Entonces, el total global de características extraídas es 98.

Entonces, la unidad de análisis 120 opera aplicando los pasos de clasificación 1508 y 1510 basados en dos algoritmos de clasificación usados para procesos de aprendizaje supervisados bien conocidos en la técnica anterior.

40 El primer algoritmo de clasificación se refiere al algoritmo del árbol de clasificación y regresión (CART). Por ejemplo, la clase "Árbol de Clasificación" de matlab se utiliza para modelar el algoritmo CART. La aplicación del primer algoritmo proporciona un primer valor de puntuación que representa la posibilidad de que la placa de Petri contenga bacterias Proteus.

45 El segundo algoritmo de clasificación se refiere al algoritmo Support Vector Machine (SVM) y se genera utilizando la biblioteca "libSVM". La aplicación del segundo algoritmo proporciona un segundo valor de puntuación que representa la posibilidad de que la placa de Petri contenga bacterias Proteus.

Como la primera puntuación y la segunda puntuación las proporcionan dos algoritmos de clasificación diferentes, la primera y la segunda puntuación no son valores comparables y no se pueden combinar en un mismo cálculo para determinar una puntuación final.

La unidad de clasificación 120 opera aplicando el teorema de Bayes para obtener valores de probabilidades a posteriori, es decir, $p(\text{Halo};X)$ donde halo es el caso que representa el halo.

5 En el primer algoritmo de clasificación, X representa el valor de la característica seleccionada por el algoritmo CART. La característica seleccionada se refiere a una característica que es la característica más discriminatoria para determinar la presencia de la bacteria *Proteus* entre las 98 características existentes.

En el segundo algoritmo de clasificación, X representa la distancia del ejemplo más próxima a la línea de decisión. La mayor distancia X representa un resultado confiable para la determinación de la posibilidad de que la placa de Petri contenga bacterias *Proteus*.

La probabilidad de presencia del halo se puede calcular con la fórmula (9) a continuación:

10 (9)
$$p(\text{Halo};X) = \frac{p(X;\text{Halo}) * p(\text{Halo})}{p(X)}$$

- donde $p(X;\text{Halo})$ es la probabilidad de observar X suponiendo que la placa de Petri contiene un Halo;

- $p(\text{Halo})$ es la probabilidad anterior de la presencia de un halo;

- y $p(\text{Halo};X)$ es la probabilidad de presencia de halo dado el valor X .

Si la placa de Petri no contiene bacterias *Proteus*, cabe esperar que la probabilidad de tener un halo sea 0.

15 Sin embargo, puede haber algunas situaciones en las que la placa de Petri contenga bacterias *Proteus* que no tengan halo visible y la probabilidad de tener un halo también sea igual a 0. Por lo tanto, para facilitar la detección de bacterias *Proteus*, la fórmula anterior (9) se enmienda para evitar considerar dichas situaciones. La fórmula (10) a continuación tiene en cuenta la hipótesis relacionada con la presencia de un halo visible para todas las bacterias *Proteus*.

La unidad de clasificación 120 entonces opera la fórmula (10) a continuación:

20 (10)
$$p(\text{Halo};X) = \frac{p(X;\text{Proteus}) * p(\text{Proteus})}{p(X)}$$

- donde $p(X;\text{Proteus})$ es la probabilidad de tener X suponiendo que la placa de Petri contiene bacterias *Proteus*;

- y $p(\text{Proteus})$ es la probabilidad a priori de la presencia de bacterias *Proteus*.

El conjunto de valores relacionados con la probabilidad $p(X;\text{Proteus})$ se representa en la figura 19 como una distribución de valores basada en una distribución gaussiana con la media μ y la desviación típica σ .

25 $p(\text{Proteus})$ es la probabilidad anterior y es un parámetro ajustable fijado en 1/6 por defecto. De hecho, un medio de cultivo CPS puede contener hasta seis clases de bacterias.

$p(X)$ es un valor estimado de un factor de normalización calculado con la fórmula (11) a continuación donde:

$p(\text{Proteus})$, $p(X;\text{Proteus})$, $p(\text{Sin Proteus})$ y $P(X;\text{Sin Proteus})$ se conocen a partir del conjunto de datos utilizados para el proceso de aprendizaje supervisado.

30 (11)
$$p(X) = p(\text{Proteus}) * p(X;\text{Proteus}) + p(\text{Sin Proteus}) * p(X;\text{Sin Proteus})$$

Por tanto, en una etapa más 1512, se calcula un primer valor de $p(\text{Halo};X)$ con la primera puntuación relacionada con el primer algoritmo de clasificación, es decir, el algoritmo CART.

En una etapa más 1514, se calcula un segundo valor de $p(\text{Halo};X)$ con la segunda puntuación relacionada con el segundo algoritmo de clasificación, es decir, el algoritmo SVM.

35 Por lo tanto, el primer y el segundo valor de $p(\text{Halo};X)$ se relacionan con una primera y una segunda probabilidad que ahora son del mismo tipo de valores, es decir, valores comparables.

Se obtienen los valores mínimos del primer y segundo valores de $p(\text{Halo};X)$ y los valores mínimos más bajos entre el primer y segundo valores de $p(\text{Halo};X)$ se seleccionan en otra etapa 1516.

A continuación, en la etapa 1516 se obtiene una probabilidad final de presencia de bacterias *Proteus* entre 0% y 100%.

40 El usuario puede decidir utilizar un valor umbral como el 50% para determinar la probabilidad de presencia de bacterias *Proteus* en la placa de Petri en la etapa 1520 comparando el valor de la probabilidad de presencia de bacterias *Proteus* en la etapa 1518.

El uso de las dos probabilidades basadas respectivamente en el primer algoritmo de clasificación y en el segundo algoritmo de clasificación proporciona una corrección de los errores producidos independientemente por cada algoritmo de clasificación.

5 En otra realización relacionada con la determinación de la presencia de bacterias Proteus, el medio de cultivo puede ser un medio de cultivo opaco tal como un CPS opaco.

La figura 20 muestra una imagen original de una placa de Petri que contiene un medio de cultivo opaco como un CPS opaco con bacterias Proteus y relacionada con una vista a contraluz.

Las figuras 21 y 22 muestran una imagen de la placa de Petri de la figura 20 relacionada respectivamente con la vista anular inferior izquierda y la vista anular superior.

10 Una realización más de la presente invención se refiere al método descrito anteriormente relacionado con la detección de bacterias Proteus en donde el medio de cultivo es un medio de cultivo opaco.

15 Las etapas 1500 y las etapas 1504 a 1520 relacionados con el método anterior siguen siendo los mismos. La etapa 1502, etapa relacionada con la aplicación de un proceso de segmentación, debe adaptarse para tener en cuenta la presencia del medio de cultivo opaco. De hecho, en presencia de un medio de cultivo opaco, el proceso de segmentación incluye la aplicación de un algoritmo de segmentación de regiones basado en gráficos adaptados y se eliminan las etapas relacionadas con la detección y eliminación de la zona de serigrafía.

20 En esta realización, las imágenes utilizadas como imágenes originales se basan en la vista a contraluz y la vista anular superior. Otros parámetros como la forma de combinar dichas imágenes originales y los valores umbral relacionados con el proceso de extracción en primer plano se adaptan para permitir que el método relacionado con la detección de bacterias Proteus con un medio de cultivo opaco funcione de manera eficiente.

La descripción siguiente se refiere a la aplicación del método de la presente invención con respecto a la detección de bacterias hemolíticas beta y la detección de bacterias Proteus.

25 El método relacionado con la detección de bacterias hemolíticas beta se ha aplicado en un primer conjunto de datos que comprende placas de Petri que contienen colonias monobacterianas y medios de cultivo de sangre en agar-agar tales como los medios de cultivo COS y CAN, habiéndose incubado dichas placas de Petri durante 24 horas.

El primer conjunto de datos comprende un total de 104 placas de Petri en las que, según la referencia de la verdad básica, 21 placas de Petri contienen bacterias hemolíticas beta y 83 placas de Petri no contienen bacterias hemolíticas beta, es decir, bacterias distintas de las bacterias hemolíticas beta.

30 La tabla 1 a continuación muestra los resultados de la aplicación del método en dicho primer conjunto de datos, en donde se han identificado 14 placas de Petri entre un número total de 21 placas de Petri que contienen bacterias hemolíticas beta y 83 placas de Petri entre un número total de 83 placas de Petri que no contienen bacterias hemolíticas beta:

Tabla 1

Resultados por placas de Petri en números para el primer conjunto de datos		Reconocimiento automatizado	
		Beta	Sin Beta
Verdad fundamental	Beta	14	7
	Sin Beta	0	83

35 De la tabla 1 se desprende que 7 placas de Petri que contienen bacterias hemolíticas beta no se han detectado e identificado al aplicar el método según la invención. De hecho, la zona de halo dentro de las correspondientes placas de Petri no es claramente visible y, por tanto, la diferencia de color entre la zona de halo y la zona del medio del cultivo para dichas placas de Petri no proporciona un nivel de contraste suficiente para determinar la presencia de bacterias hemolíticas.

40 La tabla 2 a continuación muestra los mismos resultados que se muestran en la Tabla 1 utilizando un porcentaje como indicador y un intervalo de confianza del 95%:

Tabla 2

Resultados por placas de Petri en % para el primer conjunto de datos		Reconocimiento automatizado	
		Beta	Sin Beta
Verdad fundamental	Beta	66,7% [45,4%-82,8%]	33,3%
	Sin Beta	0%	100% [95,6%-100%]

Según la tabla 2 anterior, el porcentaje de precisión global es superior al 93%.

- 5 El método relacionado con la detección de bacterias hemolíticas beta también se ha aplicado en un segundo conjunto de datos que comprende placas de Petri que contienen colonias monobacterianas y medios de cultivo de sangre en agar-agar como los medios de cultivo COS y CAN, habiéndose incubado dichas placas de Petri durante 24 horas.

El segundo conjunto de datos comprende un número total de 70 placas de Petri en las que, según la referencia de la verdad fundamental, 24 placas de Petri contienen bacterias hemolíticas beta y 46 placas de Petri contienen bacterias que no son -hemolíticas beta, es decir, bacterias distintas de las bacterias hemolíticas beta.

- 10 La tabla 3 a continuación muestra los resultados de la aplicación del método en dicho segundo conjunto de datos, en el que se han identificado 23 placas de Petri entre un número total de 241 placas de Petri que contienen bacterias hemolíticas beta y 43 placas de Petri entre un número total de 46 placas de Petri que no contienen bacterias hemolíticas beta:

Tabla 3

Resultados por placas de Petri en números para el segundo conjunto de datos		Reconocimiento automatizado	
		Beta	Sin Beta
Verdad fundamental	Beta	23	1
	Sin Beta	3	43

- 15 En la tabla 3, se muestra que 1 placa de Petri que contiene bacterias hemolíticas beta no se ha detectado ni identificado al aplicar el método según la invención. De hecho, la placa de Petri solo contiene una colonia de microorganismos y el proceso de segmentación no ha proporcionado una Máscara de Medio de Cultivo correcta ni una Máscara de Halo correcta.

- 20 En la tabla 3, también parece que se han producido 3 falsas detecciones de bacterias beta-hemolíticas. Estas falsas detecciones pueden ser generadas por la presencia de una zona de halo alrededor de colonias de bacterias hemolíticas gamma o por la presencia de la zona de serigrafía o por la presencia del borde de la placa de Petri. Sin embargo, dichas falsas detecciones pueden recuperarse en la etapa del método relacionado con la determinación del valor umbral según el método de Otsu.

- 25 La tabla 4 a continuación muestra los mismos resultados mostrados en la tabla 1 utilizando un porcentaje como indicador y con un intervalo de confianza del 95%:

Tabla 4

Resultados por placas de Petri en % para el segundo conjunto de datos		Reconocimiento automatizado	
		Beta	Sin Beta
Verdad fundamental	Beta	95,8% [79,7%-99,3%]	4,2%
	Sin Beta	6,5%	93,5% [82,5%-97,7%]

Según la tabla 4 anterior, el porcentaje de precisión global es superior al 94%.

Los resultados mostrados en las tablas 1, 2, 3 y 4 indican un alto nivel de 95% de precisión para el método de la presente invención para la detección de bacterias beta-hemolíticas.

5 El método relacionado con la detección de bacterias Proteus se ha aplicado en un primer conjunto de datos relacionados con placas de Petri que contienen colonias monobacterianas y mezclas de bacterias de dos clases diferentes de bacterias y un medio de cultivo cromógeno translúcido, habiendo sido incubadas dichas placas de Petri durante 24 horas.

El primer conjunto de datos comprende bacterias Proteus que tienen una zona halo y bacterias Proteus que no tienen una zona halo.

10 Como se describió anteriormente, el método según la presente invención para la detección de bacterias Proteus comprende una etapa para clasificar las características mediante el empleo de dos algoritmos de modelo supervisado para separar los datos de características en dos clases diferentes que son la presencia de la zona del halo o la ausencia de la zona del halo. Se utiliza el mismo conjunto de datos para cada algoritmo de modelo supervisado.

15 El análisis de los resultados se basa en la tabla 5 a continuación, que es una matriz de confusión para determinar el nivel de confusión del modelo supervisado utilizado:

Tabla 5

		Resultados	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	Verdadero positivo	Falso negativo
	Sin Proteus	Falso positivo	Verdadero negativo

20 En la situación actual, la verdad fundamental disponible es la presencia de bacterias Proteus o la ausencia de bacterias Proteus mientras que el método proporciona una predicción relacionada con la presencia o ausencia de una zona de halo.

Al considerar el modelo de aprendizaje relacionado con el árbol de clasificación y regresión, se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 6 a continuación:

Tabla 6

Primer conjunto de datos y medio de cultivo translúcido		Resultados	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	78%	22%
	Sin Proteus	1%	99%

25 La tabla 6 indica que el nivel de precisión es del 99%, que es un nivel muy bueno. El nivel de sensibilidad es del 78%, que también es un buen nivel. Como se mencionó anteriormente, el conjunto de datos comprende placas de Petri que contienen bacterias Proteus que no tienen una zona de halo. Una revisión visual del 22% de las placas de Petri mencionadas en la tabla 6 indica que la mayoría de dichas placas de Petri contienen bacterias Proteus que no tienen una zona de halo. También parece que los límites de las colonias se detectan incorrectamente como una zona de halo por el algoritmo del modelo supervisado. Sin embargo, el uso del valor de píxel medio estadístico soluciona este problema.

30

Al considerar el modelo de aprendizaje relacionado con la SVM, se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 7 a continuación:

Tabla 7

Primer conjunto de datos y medio de cultivo translúcido		Resultados	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	74%	26%
	Sin Proteus	1%	99%

El porcentaje de placas de Petri que tienen una zona de halo y no contienen bacterias Proteus difiere del porcentaje correspondiente recuperado en la tabla 6 para el árbol de clasificación y regresión.

5 Al considerar un medio de cultivo opaco, los resultados relacionados con la detección de la bacteria Proteus son bastante similares a los obtenidos con un medio de cultivo translúcido. Además, como la zona de halo es más visible en placas de Petri que comprenden un medio de cultivo opaco, el método proporciona menos detección de falsos negativos, es decir, bacterias Proteus clasificadas como Sin halo.

A partir de la descripción: CART mantiene su nodo único, con la misma característica elegida, con un tamaño único de dilatación igual a 10 píxeles.

10 La tabla 8 a continuación muestra un ejemplo de una matriz de confusión para la aplicación del algoritmo SVM:

Tabla 8

Primer conjunto de datos y medio de cultivo opaco		Resultados	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	90%	10%
	Sin Proteus	1%	99%

15 Como se explicó anteriormente en referencia a la realización de la detección de bacterias Proteus, el indicador de confianza es un porcentaje que se calcula con el teorema de Bayes utilizando la probabilidad a posteriori proporcionada por los dos algoritmos del modelo supervisado, CART y SVM. Los valores de los indicadores de confianza pertenecen a un intervalo [0;100] en el que 0% significa que no hay zona de halo y 100% significa que hay una zona de halo en la placa de Petri.

Como se ha mencionado anteriormente,

$$p(\text{Halo}; X) = \frac{p(X; \text{Proteus}) * p(\text{Proteus})}{p(X)}$$

20 – donde $p(X; \text{Proteus})$ es la probabilidad de tener X suponiendo que la placa de Petri contiene bacterias Proteus siendo X la distancia al margen;

- y $p(\text{Proteus})$ es la probabilidad a priori de la presencia de bacterias Proteus.

25 La figura 23 muestra la distribución de las probabilidades resultantes para ambos algoritmos del modelo supervisado, CART y SVM, mostrando las probabilidades para placas de Petri que contienen bacterias Proteus y para placas de Petri que no contienen bacterias Proteus con un medio de cultivo translúcido en ambas situaciones.

El círculo indica la detección de resultados falsos positivos mostrados en las tablas 6 y 7.

La figura 23 también muestra la distribución de las probabilidades finales que representan los valores Pf combinados de las probabilidades más bajas Ptree y Psvm para ambos algoritmos del modelo supervisado, CART y SVM.

Se selecciona un valor umbral del 50% tal como:

$$\begin{cases} \text{si } p(\text{Halo}; X) \geq 50\% \rightarrow \text{Halo} \\ \text{si } p(\text{Halo}; X) < 50\% \rightarrow \text{Sin Halo} \end{cases}$$

30

La tabla 9 a continuación evalúa los resultados de los indicadores de confianza:

Tabla 9

Medio de cultivo translúcido		Resultados (% y número correspondiente de placas de Petri)	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	71% 17/24	29% 7/24
	Sin Proteus	<1% 1/151	>99% 150/151

5 La tabla 9 anterior demuestra que el nivel de precisión es superior al 99%, que es un nivel muy bueno. De hecho, la combinación de los resultados proporcionados por los dos algoritmos del modelo supervisado evita la detección de falsos positivos.

Además, el nivel de sensibilidad es del 71%, que también es un buen nivel, ya que algunas placas de Petri contienen bacterias Proteus que no tienen una zona de halo.

10 La figura 24 muestra la distribución de las probabilidades resultantes para ambos algoritmos del modelo supervisado, CART y SVM, mostrando las probabilidades para placas de Petri que contienen bacterias Proteus y un medio de cultivo opaco, y para placas de Petri que no contienen bacterias Proteus con un medio de cultivo opaco. para ambas situaciones.

La figura 24 también muestra la distribución de las probabilidades finales que representan los valores combinados Pf de las probabilidades menores Ptree y Psvm para ambos algoritmos del modelo supervisado, CART y SVM.

Tabla 10

Primer conjunto de datos y medio de cultivo opaco		Resultados	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	89% 25/28	11% 3/28
	Sin Proteus	0% 0/126	100% 126/126

15

En otra situación en la que las placas de Petri se han incubado durante 18 horas, los resultados mostrados en la tabla 11 a continuación se obtienen para un medio de cultivo translúcido:

Tabla 11

Medio de cultivo translúcido		Resultados (% y número correspondiente de placas de Petri)	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	74% 17/23	29% 6/23
	Sin Proteus	<1% 1/141	>99% 140/141

20 Los resultados correspondientes para un medio de cultivo opaco se muestran en la tabla 12 a continuación:

Tabla 12

Medio de cultivo opaco		Resultados (% y número correspondiente de placas de Petri)	
		Halo	Sin halo
Verdad fundamental	Proteus	92% 24/26	8% 2/26
	Sin Proteus	0% 0/139	100% 139/139

Como se muestra en las tablas 11 y 12 anteriores, los resultados obtenidos para duraciones de 18 horas y 24 horas son estables para placas de Petri que contienen medio de cultivo translúcido u opaco.

5 Referencias bibliográficas

[1] Pedro F. Felzenszwalb, Daniel P. Huttenlocher, "Efficient Graph-Based Image Segmentation"; International Journal of Computer Vision, septiembre de 2004, volumen 59, número 2, páginas 167-181

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado en una placa de Petri que comprende una o más colonias de microorganismos y un medio de cultivo, estando dicho medio de cultivo adaptado para permitir una o más colonias de microorganismos y dicho al menos microorganismo determinado, si está presente, para crecer en condiciones de crecimiento adecuadas, el método comprende:
- 5
- obtener, utilizando un sistema de captación de imágenes, al menos una imagen inicial de la placa de Petri, en la que la primera imagen inicial comprende uno o más píxeles visibles, estando asociado cada píxel a un valor de píxel;
 - 10 - obtener una primera imagen procesada de la placa de Petri aplicando un primer proceso a la al menos una imagen inicial, en donde los píxeles visibles de la primera imagen procesada solo se refieren a los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos;
 - 15 - obtener una pluralidad de segundas imágenes procesadas de la placa de Petri aplicando un segundo proceso a la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de la segunda imagen procesada solo se relacionan con los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos y una zona circundante alrededor de dichas una o más colonias de microorganismos;
 - obtener una pluralidad de terceras imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre la al menos una imagen inicial y la pluralidad de segundas imágenes procesadas, en donde la pluralidad de terceras imágenes procesadas comprende píxeles visibles que solo se refieren a píxeles asociados al cultivo medio;
 - 20 - obtener una pluralidad de cuartas imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre la pluralidad de segundas imágenes procesadas y la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de la pluralidad de cuartas imágenes procesadas sólo se refieren a píxeles asociados a la zona circundante;
 - 25 - determinar valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y cuarta imágenes procesadas calculando los valores de diferencia entre los valores de píxel promedio de la pluralidad de la tercera imagen procesada y los valores de píxel promedio de la pluralidad de la cuarta imagen procesada durante al menos cada canal de color de los canales de color rojo verde azul (RVA);
 - determinar un valor de un indicador de la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri clasificando los valores de las características determinadas;
 - comparar el valor del indicador con un valor umbral;
 - 30 - según el resultado de la comparación, determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el primer proceso es un proceso de segmentación.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el proceso de segmentación comprende la determinación de un valor umbral y una comparación de los valores de los píxeles con dicho valor umbral.
- 35 4. El método según la reivindicación 2, en el que el proceso de segmentación es un proceso de segmentación de regiones basado en gráficos.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el segundo proceso es un proceso de dilatación asociado a un criterio de dilatación que tiene una pluralidad de valores definidos.
- 40 6. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación de valores de características comprende dividir la pluralidad de la tercera y cuarta imágenes procesadas en parches de píxeles.
7. El método según la reivindicación 6, que comprende además calcular la diferencia máxima de valores de píxeles entre los valores de píxeles de la tercera y cuarta imágenes procesadas, para cada parche de píxeles.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la etapa de determinar los valores de características comprende calcular la diferencia máxima de valores de píxeles para la imagen en escala de grises.
- 45 9. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar valores de características comprende calcular los valores medianos de píxeles de la pluralidad de las primeras imágenes procesadas y los valores medianos de píxeles de la pluralidad de la primera imagen procesada para el espacio CSV.
10. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de clasificar los valores de características comprende comparar la distribución de valores de características con una distribución gaussiana.
- 50 11. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de clasificar los valores de características comprende

aplicar un algoritmo de árbol de clasificación y regresión y un algoritmo de vector de soporte para proporcionar una primera y segunda puntuación correspondientes.

12. El método según la reivindicación 11, en el que la etapa de clasificación de los valores de características comprende además aplicar el teorema de Bayes a la primera y segunda puntuación.

5 13. El método según la reivindicación 12, en el que la etapa de clasificar los valores de características comprende además obtener una posibilidad combinada de la presencia de la zona circundante.

14. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de comparar el valor del indicador con un umbral comprende la determinación de un valor umbral en función de la media y la desviación típica σ de la distribución gaussiana.

10 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 o 14, en el que la etapa de determinación de la presencia de al menos el microorganismo determinado comprende la determinación de la presencia de una bacteria que es una bacteria hemolítica beta.

16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 9, 11, 12 o 13, en el que la etapa de determinación de la presencia de al menos el microorganismo determinado comprende la determinación de la presencia de una bacteria que es una bacteria Proteus.

15 17. Un sistema (100) para determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado en una placa de Petri que comprende una o más colonias de microorganismos y un medio de cultivo, estando dicho medio de cultivo adaptado para permitir una o más colonias de microorganismos y dicho al menos determinado microorganismo, si está presente, para crecer en condiciones de crecimiento adecuadas, en el que el sistema comprende un sistema de captación de imágenes para obtener al menos una imagen inicial de la placa de Petri, y un sistema de procesamiento (108), comprendiendo dicho sistema de procesamiento (108):

- una primera unidad de procesamiento (116) para obtener una primera imagen procesada de al menos una imagen inicial de la placa de Petri, en la que los píxeles visibles de la primera imagen procesada solo se refieren a los píxeles asociados con una o más colonias de microorganismos;

25 - una segunda unidad de procesamiento (118) para obtener una pluralidad de segundas imágenes procesadas de la primera imagen procesada de la placa de Petri, en la que los píxeles visibles de las segundas imágenes procesadas solo se refieren a los píxeles asociados a una o más colonias de microorganismos y una zona circundante alrededor de dicha una o más colonias de microorganismos;

30 - una unidad de cálculo (120) para obtener una pluralidad de terceras imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre una segunda imagen inicial y las segundas imágenes procesadas, en donde los píxeles visibles de las terceras imágenes procesadas solo se refieren a píxeles asociados al cultivo medio, y para obtener una pluralidad de cuartas imágenes procesadas de la placa de Petri calculando la diferencia entre las segundas imágenes procesadas y la primera imagen procesada, en donde los píxeles visibles de las cuartas imágenes procesadas solo se refieren a píxeles asociados a la zona circundante;

35 - una unidad de extracción de características (122) para determinar valores de características asociados a la pluralidad de la tercera y la cuarta imágenes procesadas calculando los valores de diferencia entre los valores de píxeles promedio de las terceras imágenes procesadas y los valores de píxeles promedio de las cuartas imágenes procesadas para al menos cada canal de color de los canales de color RVA;

40 - y una unidad de análisis (110) para determinar un valor de un indicador de la presencia del al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri, comparando el valor del indicador con un valor umbral; y determinar la presencia de al menos un microorganismo determinado dentro de la zona circundante en la placa de Petri, dependiendo del resultado de la comparación.

18. Un producto de programa informático que comprende instrucciones que, cuando se ejecutan, hacen que un aparato de procesamiento de datos programable lleve a cabo etapas del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

45

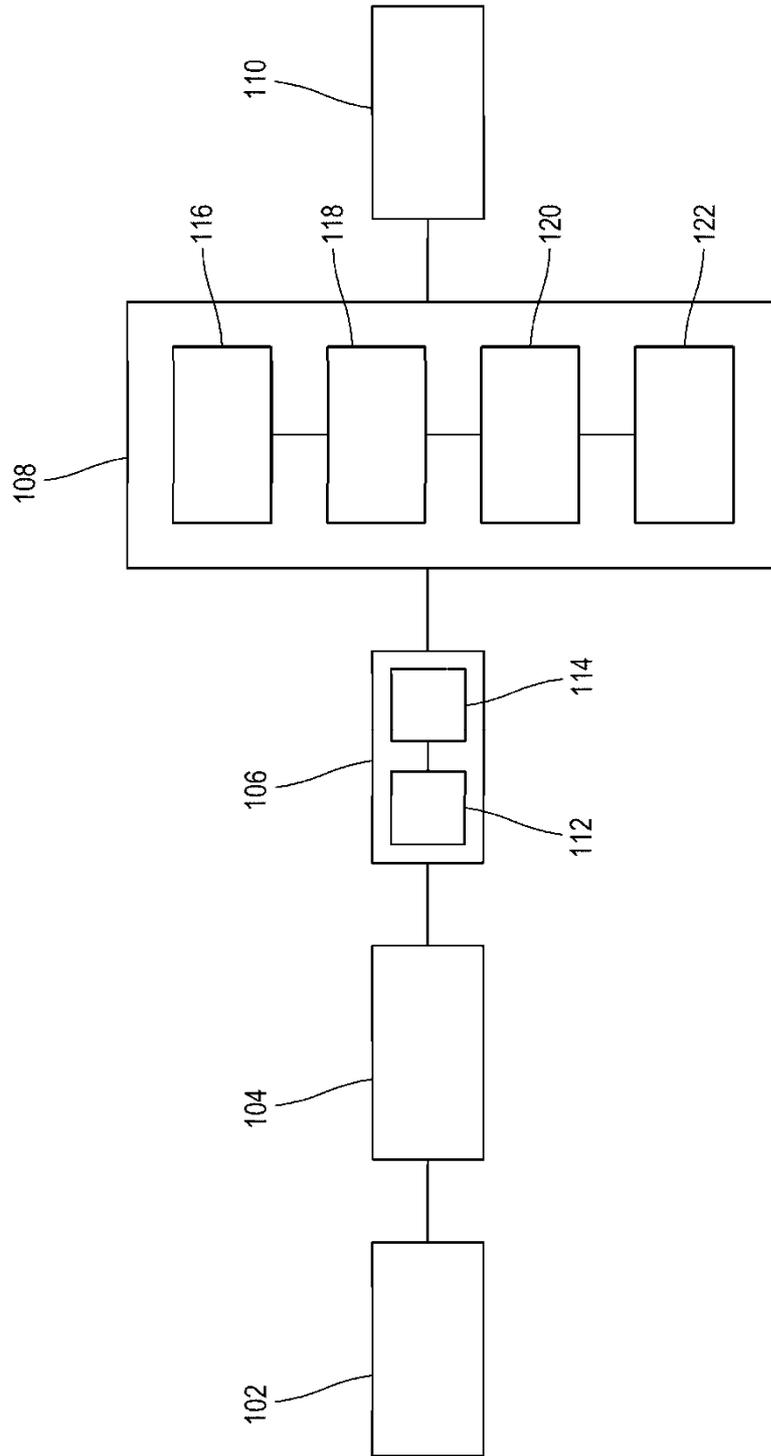
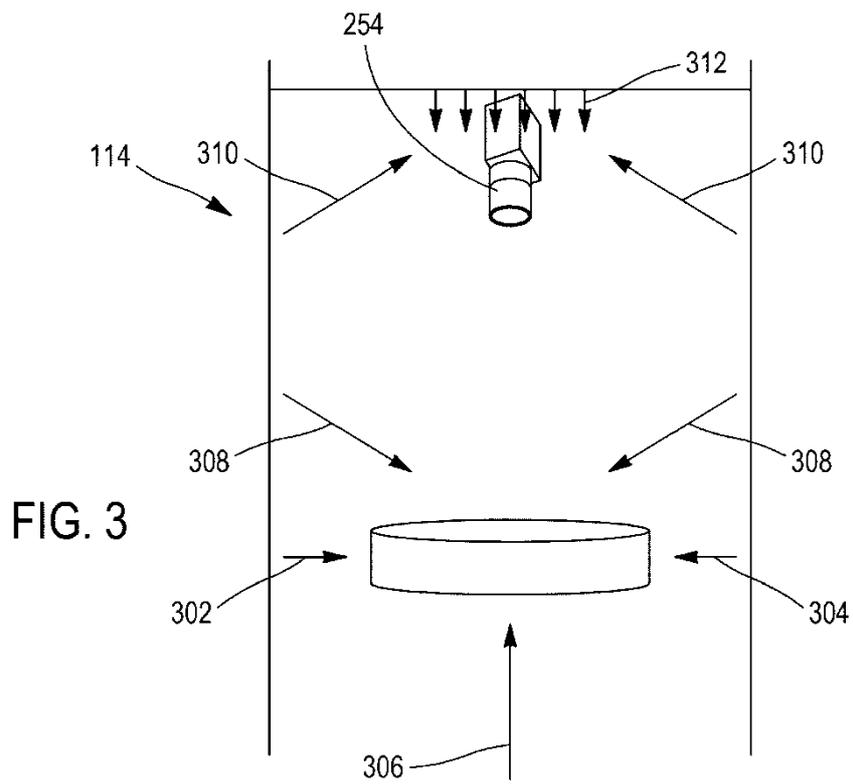
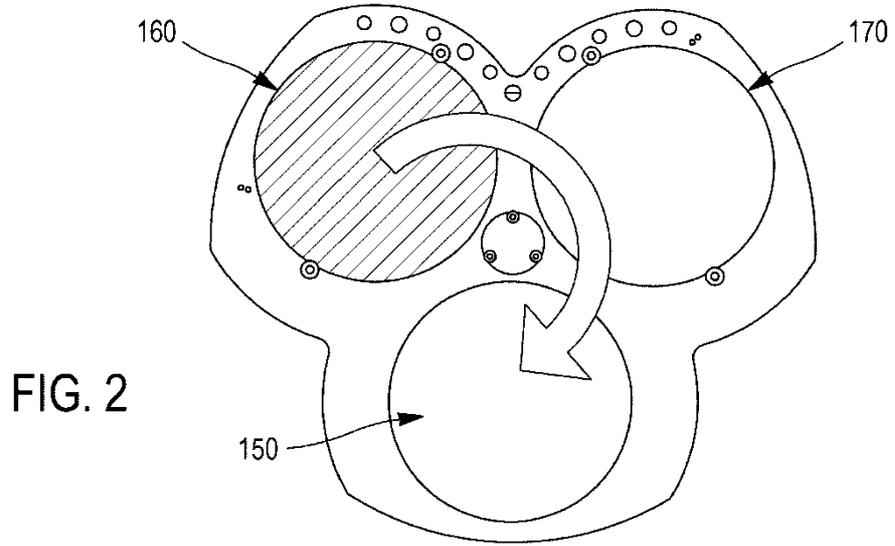


FIG. 1



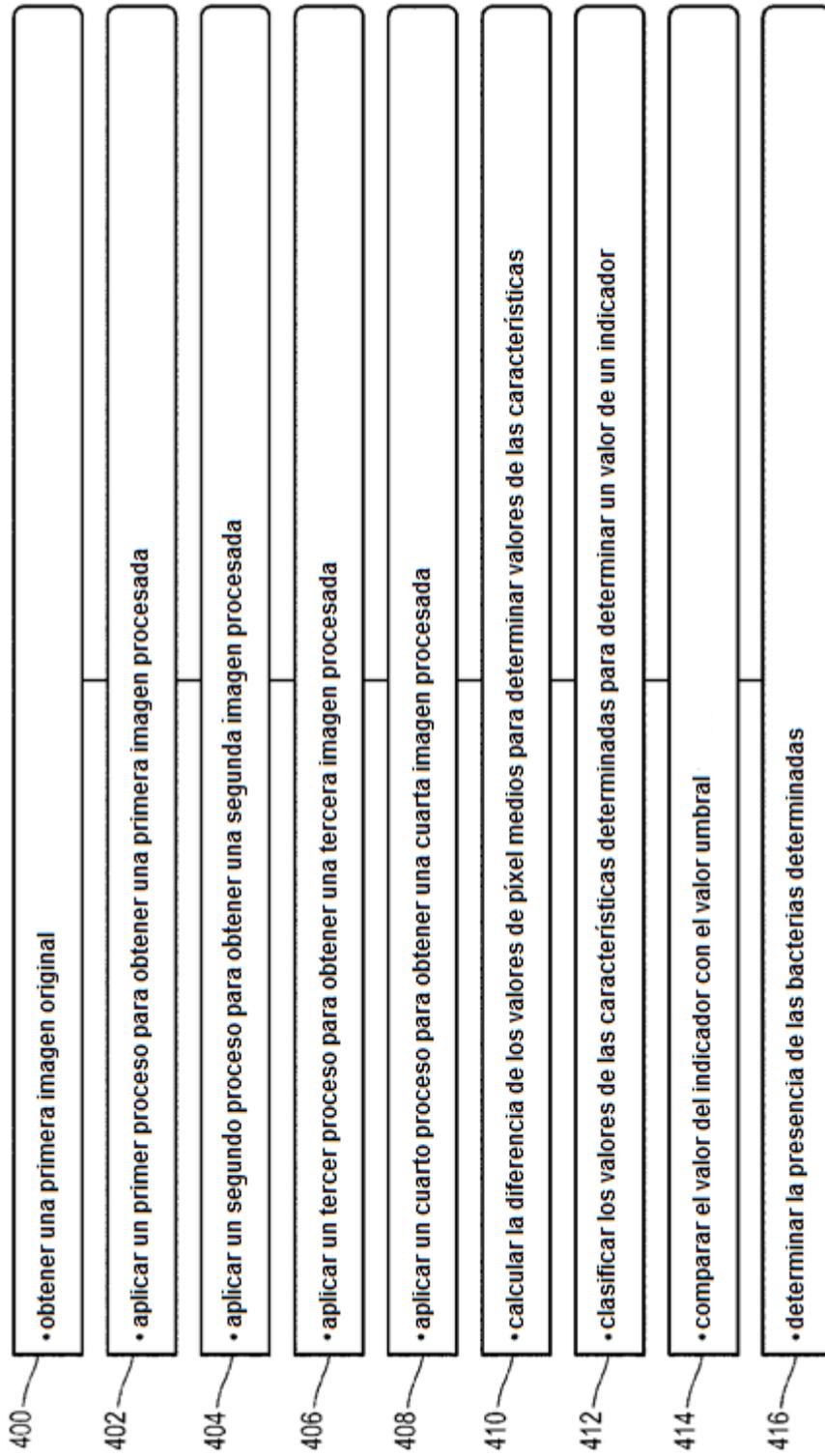


FIG. 4

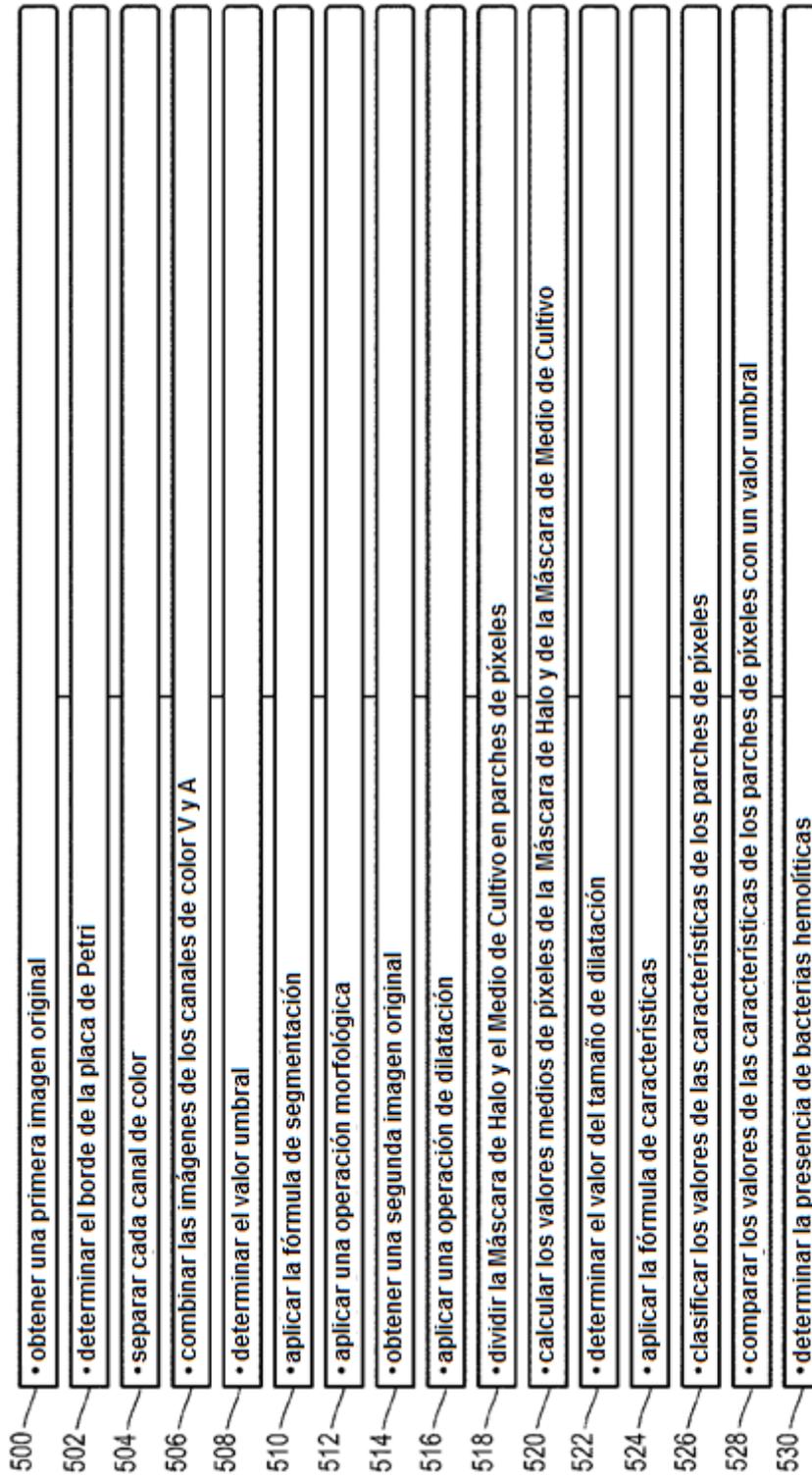


FIG. 5

FIG. 6

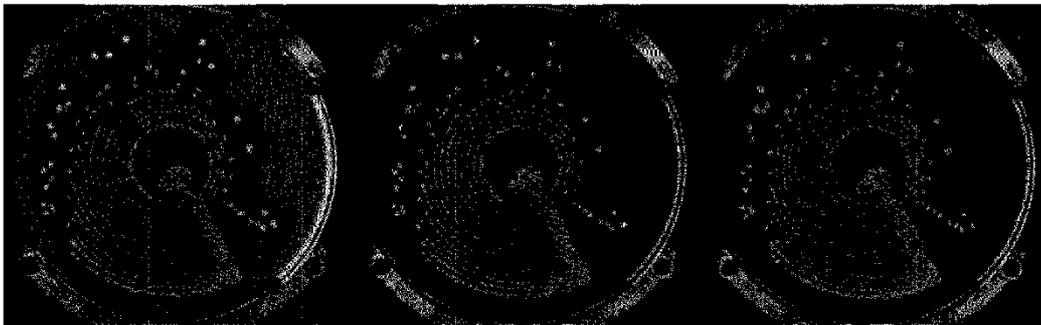
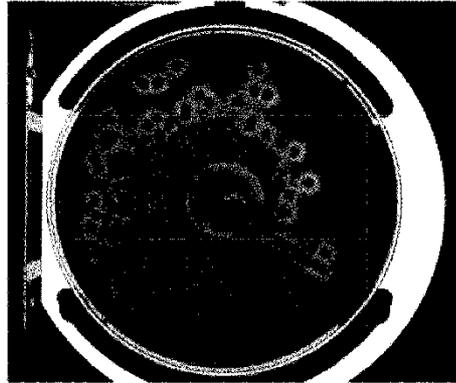
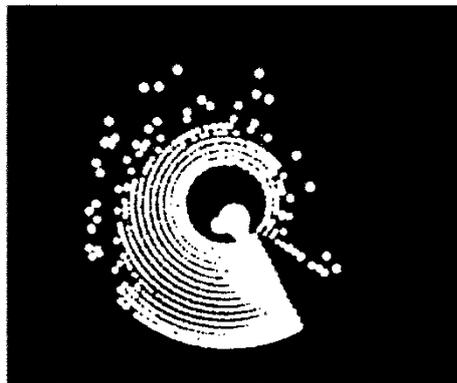


FIG. 7a

FIG. 7b

FIG. 7c

FIG. 8



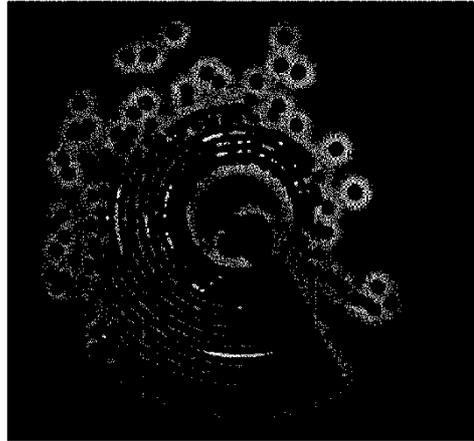


FIG. 9a



FIG. 9b

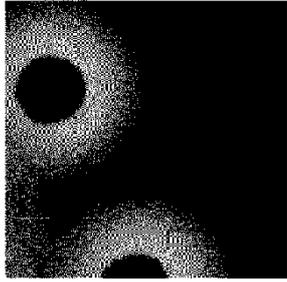


FIG. 10a

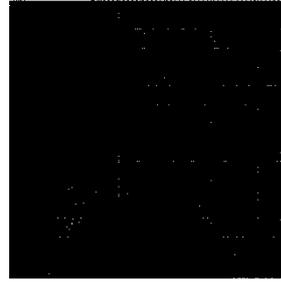


FIG. 10b

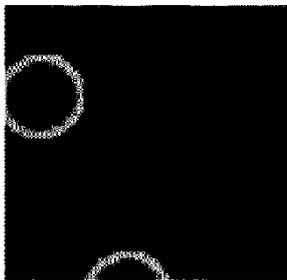


FIG. 11a

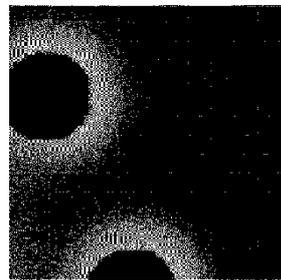


FIG. 11b

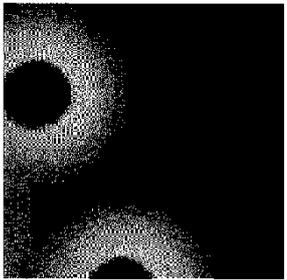


FIG. 12a

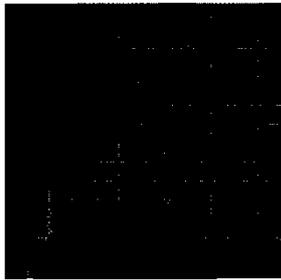


FIG. 12b

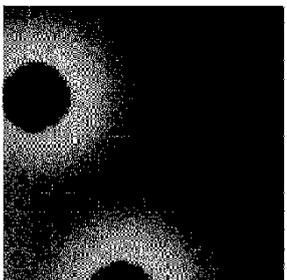


FIG. 13a

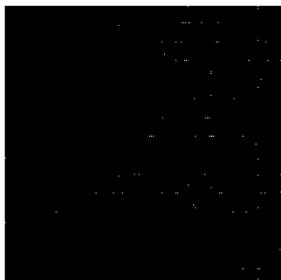


FIG. 13b

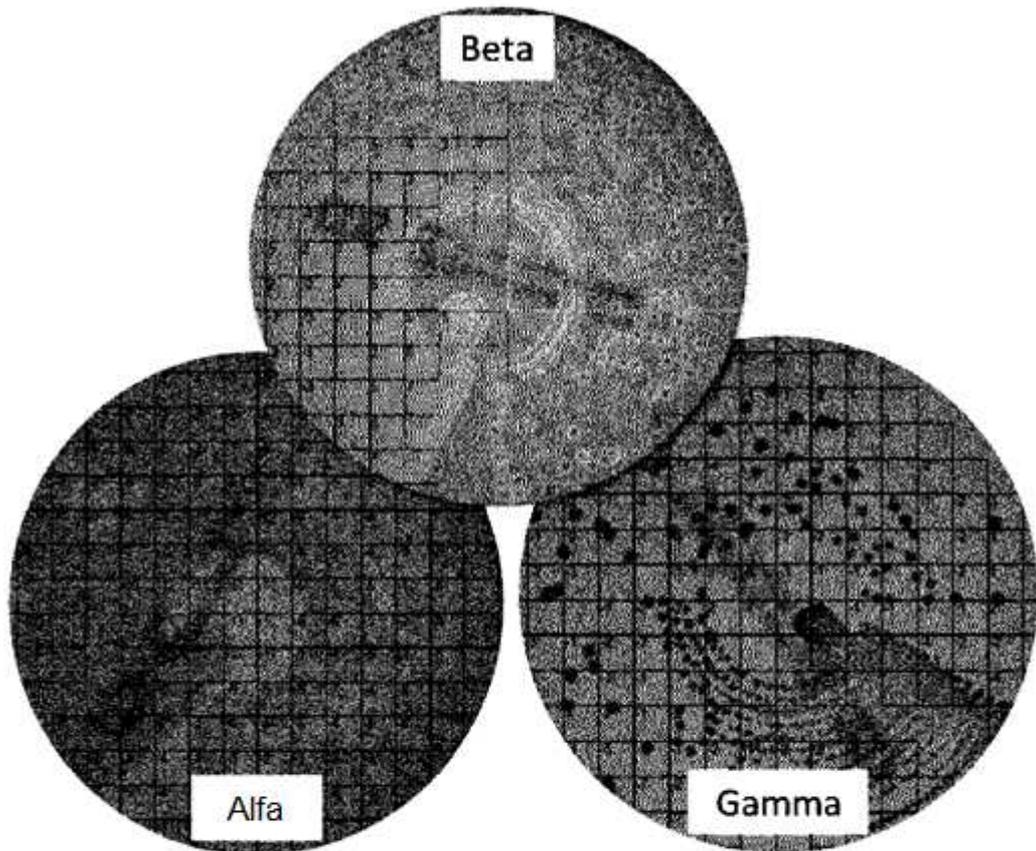


FIG. 14a

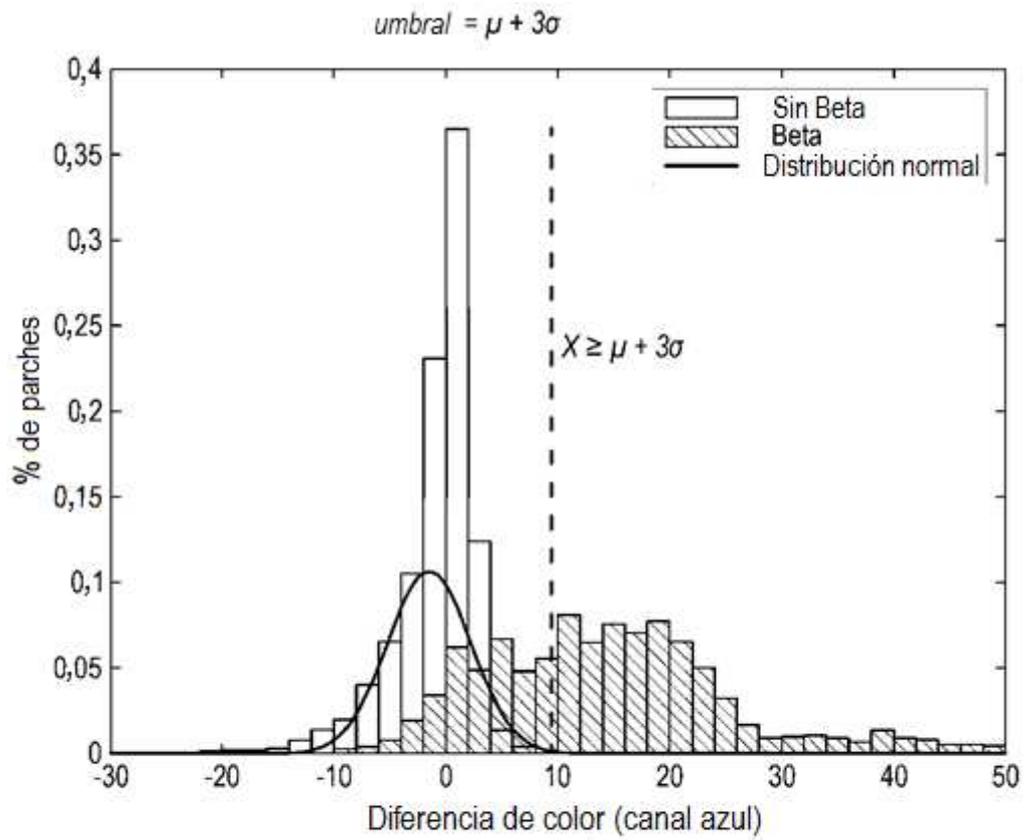


FIG. 14b

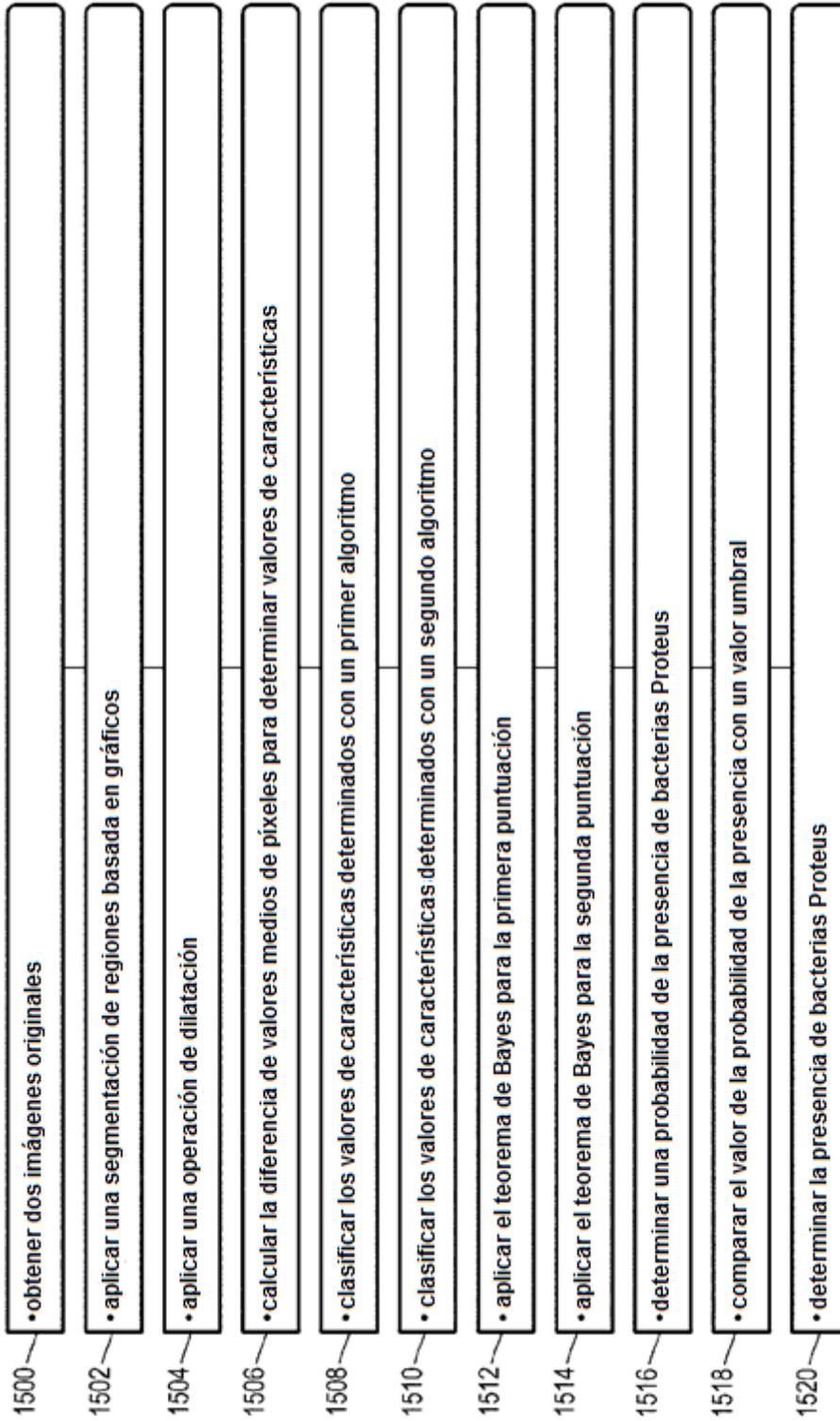


FIG. 15

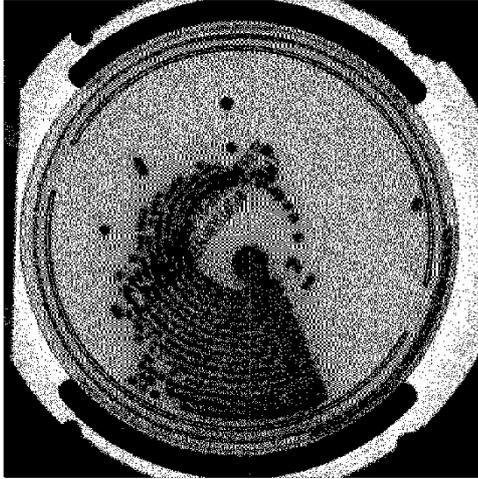


FIG. 16a

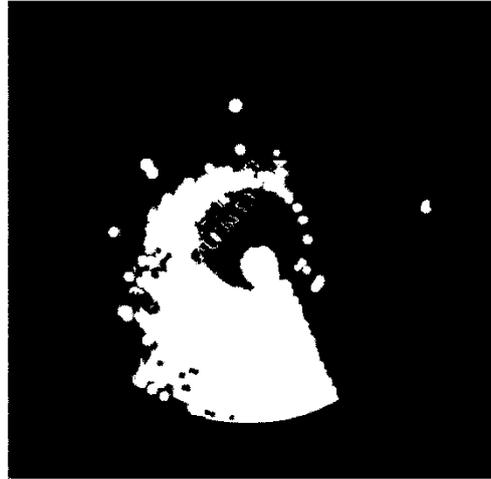


FIG. 16b



FIG. 17a

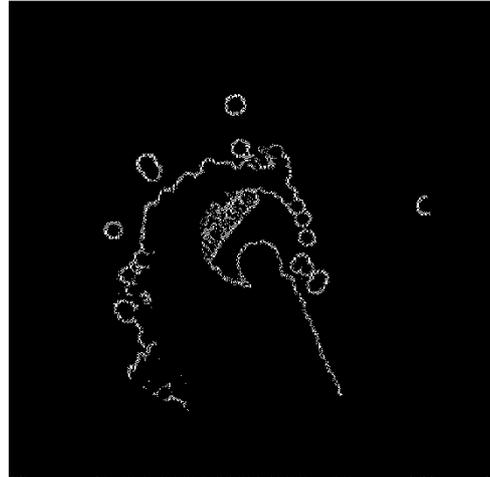


FIG. 17b

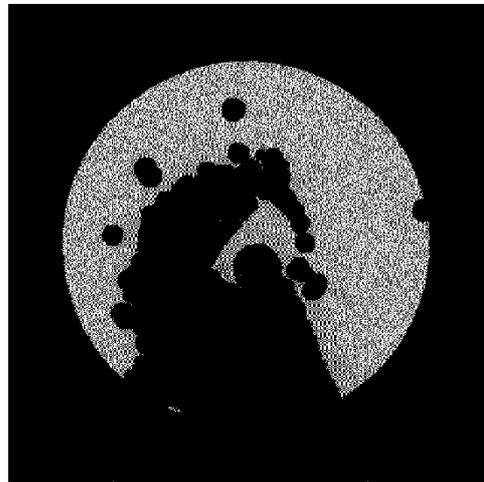


FIG. 17c

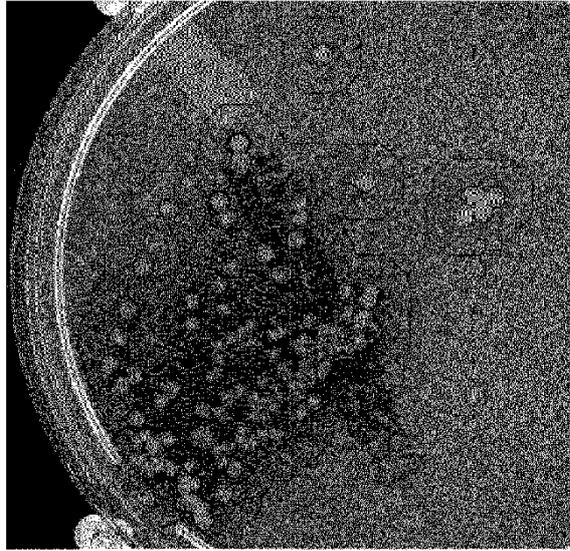


FIG. 18a

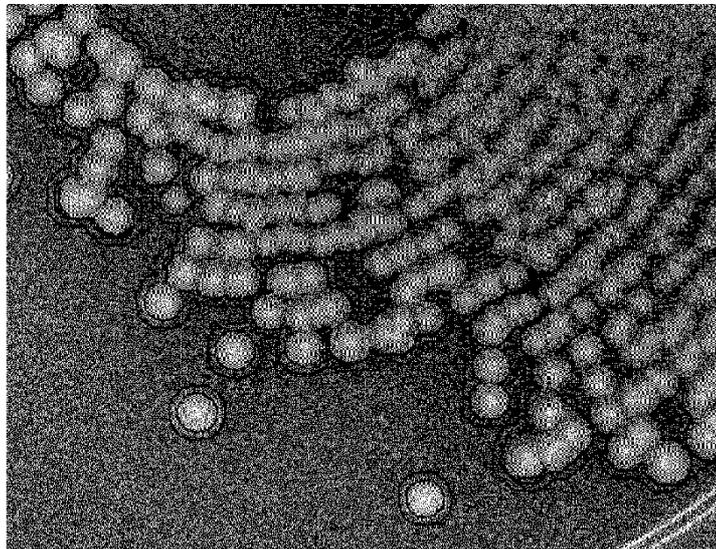


FIG. 18b

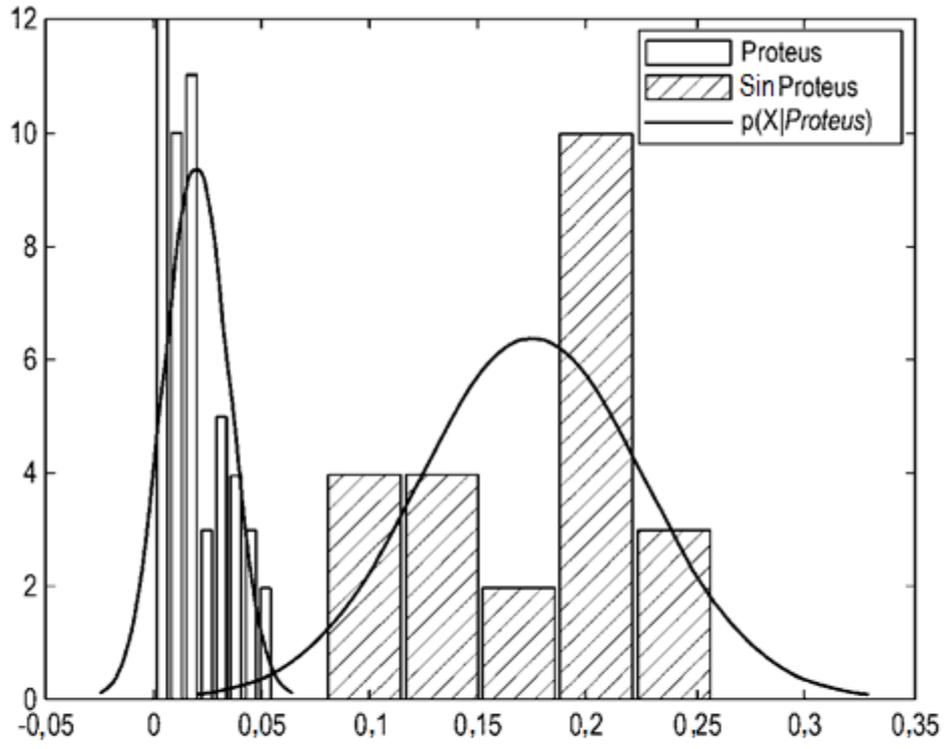


FIG. 19

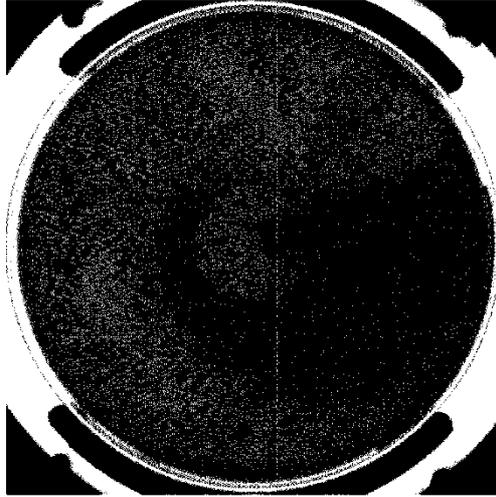


FIG. 20

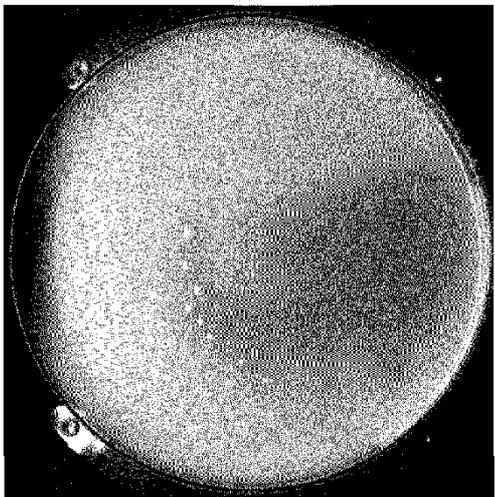


FIG. 21

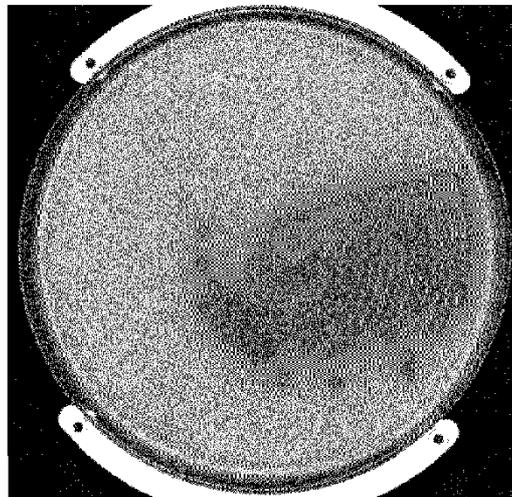


FIG. 22

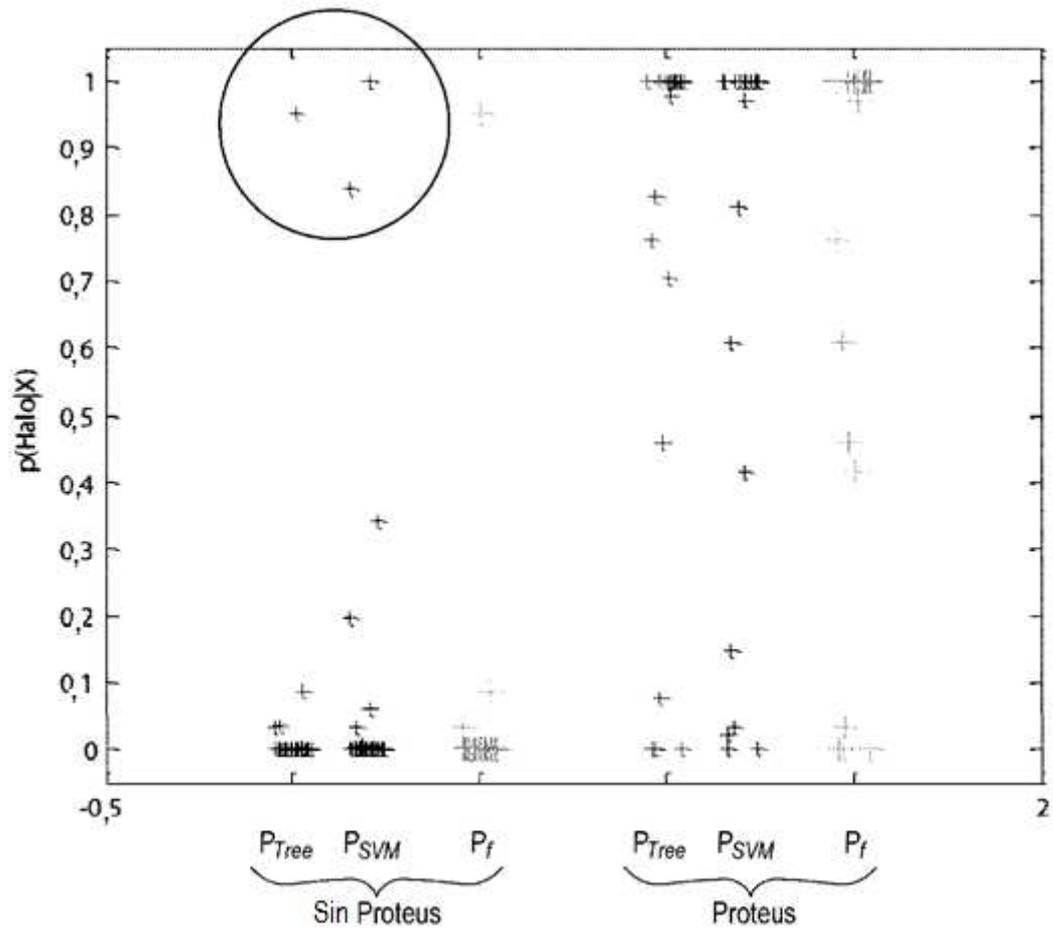


FIG. 23

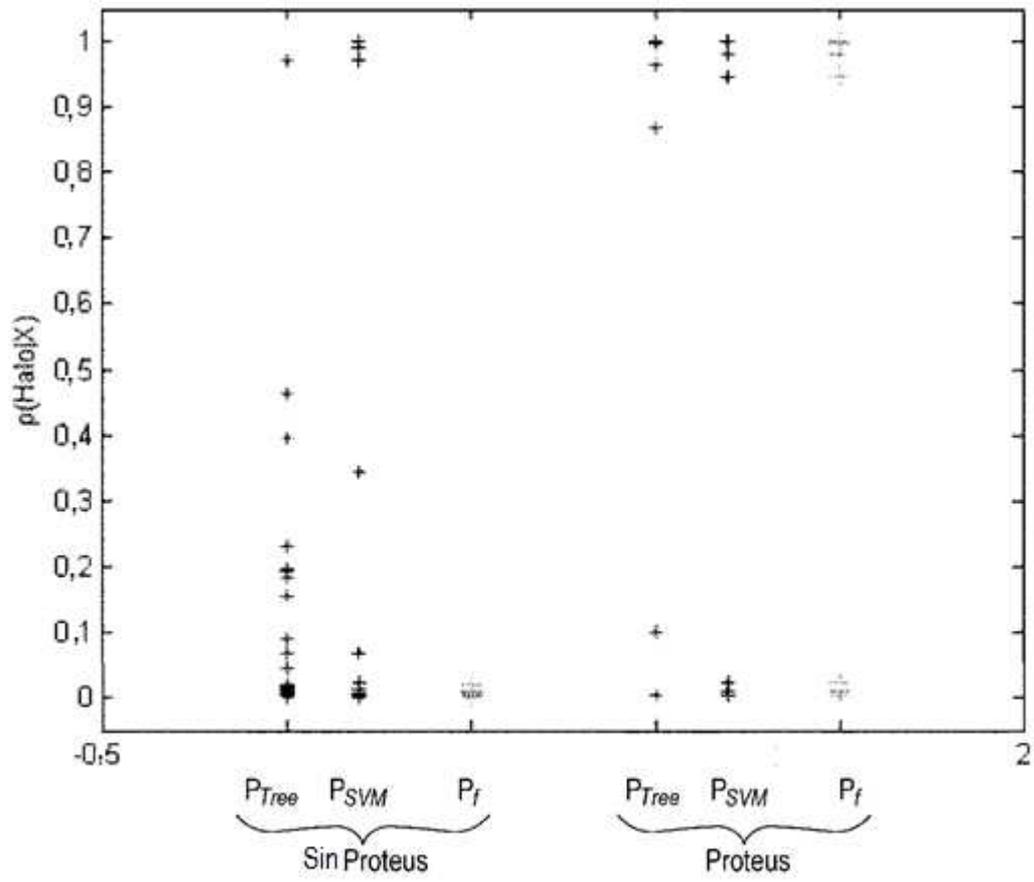


FIG. 24