

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 964**

51 Int. Cl.:

G01N 21/01 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 09724123 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2271911**

54 Título: **Análisis espectral de medios de crecimiento biológicos**

30 Prioridad:

26.03.2008 US 39453 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2013

73 Titular/es:

**3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
(100.0%)
3M Center Post Office Box 33427
Saint Paul, MN 55133-3427, US**

72 Inventor/es:

BOLEA, PHILLIP A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 434 964 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

Análisis espectral de medios de crecimiento biológicos

Antecedentes

5 La seguridad biológica es un problema de capital importancia en la sociedad moderna. Las pruebas para detectar la contaminación biológica en los alimentos o en otros materiales se ha convertido en un requisito importante y algunas veces obligatorio para los fabricantes y distribuidores de productos alimenticios. Las pruebas biológicas también se utilizan para identificar bacterias y otros agentes en las muestras de laboratorio, tales como muestras de sangre tomadas de pacientes enfermos, muestras de laboratorio generadas con fines experimentales y otros tipos de muestras biológicas. Se pueden utilizar diferentes técnicas y dispositivos para mejorar las pruebas biológicas y simplificar y estandarizar el procesamiento de las pruebas biológicas.

10 En particular, se ha desarrollado una amplia abanico de medios de crecimiento biológico. A modo de ejemplo, la 3M Company (de ahora en adelante «3M») de St. Paul, Minnesota, ha desarrollado medios de crecimiento biológico en forma de placas de crecimiento. Las placas de crecimiento biológico las vende 3M con el nombre comercial de placas PETRIFILM. Las placas de crecimiento biológico se pueden utilizar para facilitar el crecimiento rápido y la detección o recuento de bacterias u otros agentes biológicos asociados con frecuencia a la contaminación de la comida, entre ellos, por ejemplo, bacterias aerobias, *E. coli*, coliformes, *Enterobacteriaceae*, levaduras, mohos, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Campylobacter* y otros agentes biológicos. El uso de las placas PETRIFILM, u otros medios de crecimiento biológico, puede simplificar el análisis de las bacterias en las muestras de alimentos.

15 Los medios de crecimiento biológico pueden utilizarse para identificar la presencia de bacterias, de modo que se puedan tomar medidas correctoras (en el caso de análisis de alimentos) o se pueda realizar un diagnóstico adecuado (en el caso del uso médico). En otras aplicaciones se pueden utilizar los medios de crecimiento biológico para hacer crecer con rapidez las bacterias u otros agentes biológicos de las muestras de laboratorio, p. ej., con fines experimentales.

20 Los sistemas de procesamiento de medios de crecimiento biológico se refieren a los sistemas utilizados para procesar los medios de crecimiento biológico. Los sistemas de procesamiento de medios de crecimiento biológico se pueden utilizar para contar colonias bacterianas, o la cantidad de un agente biológico concreto en un medio de crecimiento biológico. Por ejemplo, se puede colocar una muestra de alimento o una muestra de laboratorio en un medio de crecimiento biológico y luego se puede introducir el medio en una cámara de incubación. Tras la incubación, el medio de crecimiento biológico puede introducirse en un lector biológico, que genera una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico. A continuación, las imágenes pueden analizarse, p. ej. con un ordenador, para contar automáticamente el crecimiento bacteriano. De este modo, los sistemas de procesamiento de medios de crecimiento biológico automatizan la detección y el recuento de las bacterias o de otros agentes biológicos en un medio de crecimiento biológico y, por tanto, mejoran el procesamiento de las pruebas biológicas al reducir el error humano.

25 La patente de los EE.UU. n.º 6.063.590 describe un método para detectar bacterias que utiliza luz ultravioleta y visible. Sin embargo, todavía hay que mejorar la discriminación entre la colonia y el fondo de las colonias de microorganismos, así como mejorar un método de identificación y cuantificación de los microorganismos.

Compendio

30 De forma general, esta descripción se refiere a técnicas de adquisición de imágenes y a técnicas de análisis de imágenes para el análisis automático de medios de crecimiento biológico. De acuerdo con esta descripción, las respuestas espectrales de los medios de crecimiento biológico pueden utilizarse para identificar y contar agentes biológicos a partir de las imágenes de los medios de crecimiento biológico. Los medios de crecimiento biológico pueden iluminarse con dos o más longitudes de onda diferentes de radiación electromagnética, y las imágenes de los medios de crecimiento biológico pueden capturarse con estas iluminaciones diferentes. Los valores de reflectancia espectral de una o varias primeras imágenes (p. ej., asociada a la posición de los píxeles) se pueden normalizar basándose en los valores de reflectancia espectral de una o varias segundas imágenes (p. ej., asociada a las mismas posiciones de los píxeles). En este caso, las primeras imágenes están asociadas a una longitud de onda de iluminación diferente a la de las segundas imágenes. La normalización podría permitir la mejor identificación de los agentes biológicos que se manifiestan en los medios de crecimiento biológico. De este modo, el análisis espectral y la normalización podrían mejorar la detección automática de los agentes biológicos.

35 Las primeras imágenes pueden generarse con una iluminación de luz en un primer margen de longitudes de onda, y las segundas imágenes pueden generarse con una iluminación de luz en un segundo margen de longitudes de onda. La respuesta espectral de los agentes biológicos y la respuesta espectral del fondo pueden diferir en los diferentes márgenes de las longitudes de onda. Las segundas imágenes pueden utilizarse para normalizar las primeras imágenes, y pueden hacer mejorar la capacidad de distinguir entre el fondo de los medios biológicos y los agentes biológicos que se manifiestan en los medios. La iluminación utilizada para las primeras imágenes puede estar dentro de un espectro visible, y la iluminación utilizada para las segundas imágenes puede estar fuera del espectro visible.

Esta descripción da a conocer un método de acuerdo con la presente invención que comprende iluminar la placa de crecimiento biológico con una primera radiación electromagnética que se encuentra dentro del espectro visible; utilizar un periférico de adquisición de imágenes para generar una o varias primeras imágenes de la placa de crecimiento biológico iluminada con la primera radiación electromagnética; iluminar la placa de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética que se encuentra entre 800 nm y 900 nm; utilizar el periférico de adquisición de imágenes para generar una o varias segundas imágenes de la placa de crecimiento biológico iluminada con la segunda radiación electromagnética; normalizar los valores de reflectancia espectral de una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes; identificar las colonias de microorganismos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral; y contar las colonias de microorganismos que se han identificado.

Se describe adicionalmente un sistema que comprende una unidad de adquisición de imágenes que ilumina un medio de crecimiento biológico con radiación electromagnética que está fuera del espectro visible y que genera una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la radiación electromagnética de fuera del espectro visible, y un ordenador que cuenta los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico basándose en la una o varias imágenes.

Se describe adicionalmente un sistema que comprende una unidad de adquisición de imágenes que ilumina un medio de crecimiento biológico con una primera radiación electromagnética, que genera una o varias primeras imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la primera radiación electromagnética, que ilumina el medio de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética, y que genera una o varias segundas imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la segunda radiación electromagnética. El sistema también incluye un ordenador que normaliza los valores de reflectancia espectral en la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes, identifica los agentes biológicos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral, y cuenta los agentes biológicos que se han identificado.

Se describe adicionalmente un sistema que comprende medios para iluminar un medio de crecimiento biológico con radiación electromagnética que está fuera del espectro visible, medios para generar una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la radiación electromagnética de fuera del espectro visible, y medios para contar agentes biológicos en el medio de crecimiento biológico basándose en la una o varias imágenes.

Se describe adicionalmente un sistema que comprende medios para iluminar un medio de crecimiento biológico con la primera radiación electromagnética, medios para generar una o varias primeras imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la primera radiación electromagnética, medios para iluminar el medio de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética, medios para generar una o varias segundas imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la segunda radiación electromagnética, medios para normalizar los valores de reflectancia espectral en la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes, medios para identificar los agentes biológicos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral, y medios para contar los agentes biológicos que se han identificado.

Se describe adicionalmente un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, tras su ejecución en un ordenador de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico, hace que el ordenador reciba una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la radiación electromagnética de fuera del espectro visible, y cuente los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico basándose en la una o varias imágenes.

Se describe adicionalmente un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, tras su ejecución en un ordenador de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico, hace que el ordenador reciba una o varias primeras imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias primeras imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la primera radiación electromagnética, reciba una o varias segundas imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias segundas imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética, normalice los valores de reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes, identifique los agentes biológicos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral, y cuente los agentes biológicos que se han identificado.

Se presentan más detalles en los dibujos acompañantes y en la descripción que viene a continuación. Otras características, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en perspectiva de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico de ejemplo capaz de ejecutar una o varias de las técnicas descritas en la presente memoria durante el procesamiento de un medio de crecimiento biológico.

La figura 2 es una vista superior de un medio de crecimiento biológico de ejemplo en forma de placa de crecimiento biológico de acuerdo con esta descripción.

La figura 3 es un diagrama de bloques de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico acorde con esta descripción.

La figura 4 es un gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a las diferentes posiciones de un medio de crecimiento biológico.

- 5 La figura 5 es un diagrama de bloques que ilustra la iluminación de un medio de crecimiento biológico dentro de un periférico de iluminación.

La figura 6 es un gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a un agente biológico formado en un medio de crecimiento biológico y la respuesta espectral asociada a una región del fondo del medio de crecimiento biológico.

- 10 La figura 7 es otro gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a un agente biológico formado en un medio de crecimiento biológico y la respuesta espectral asociada a una región de fondo del medio de crecimiento biológico.

Las figuras 8 y 9 son diagramas de flujo que ilustran técnicas de esta descripción.

Descripción detallada

- Esta descripción se refiere a técnicas de adquisición de imágenes y técnicas de análisis de imágenes para el análisis automático de los medios de crecimiento biológico. Los medios de crecimiento biológico comprenden al menos un nutriente que sostiene el crecimiento de los microorganismos y, opcionalmente, puede comprender al menos un indicador para facilitar la detección de un microorganismo específico o de un grupo de microorganismos. De acuerdo con esta descripción, los valores de reflectancia espectral medidos de los medios de crecimiento biológico se pueden utilizar para identificar y contar agentes biológicos a partir de las imágenes de medios de crecimiento biológico. En particular, para identificar y contar los agentes biológicos se pueden utilizar los valores de reflectancia espectral de los medios de crecimiento biológico a dos o más márgenes diferentes de longitudes de onda.

- Los medios de crecimiento biológico pueden iluminarse con dos o más longitudes de onda diferentes de radiación electromagnética, y las imágenes de los medios de crecimiento biológico pueden capturarse con estas iluminaciones diferentes. Los valores de reflectancia espectral de una o varias primeras imágenes se pueden normalizar basándose en los valores de reflectancia espectral de una o varias segundas imágenes para identificar mejor los agentes biológicos que se manifiestan en los medios de crecimiento biológico. Por ejemplo, el valor de reflectancia espectral en una posición específica de píxeles de una primera imagen puede normalizarse basándose en los valores de reflectancia espectral en la misma posición de píxeles de una o varias segundas imágenes. La normalización puede utilizar proporciones, en cuyo caso, las proporciones de los valores de reflectancia espectral en las posiciones de los píxeles de las primeras imágenes entre los valores de reflectancia espectral en las mismas posiciones de píxeles de las segundas imágenes pueden utilizarse para identificar los agentes biológicos y para identificar las regiones de fondo de los medios de crecimiento biológico. De este modo, el análisis espectral puede mejorar la detección automática de los agentes biológicos.

- Las primeras imágenes se generan con una iluminación de luz en un primer intervalo de longitudes de onda, y las segundas imágenes se generan con una iluminación de luz en un segundo intervalo de longitudes de onda. La respuesta espectral de los agentes biológicos con respecto a la de las áreas de fondo puede diferir con las diferentes iluminaciones. De acuerdo con esta descripción, las primeras imágenes se pueden normalizar basándose en las segundas imágenes, lo que mejora la capacidad de diferenciar entre el fondo de los medios biológicos y los agentes biológicos que se manifiestan en los medios. Los valores de reflectancia espectral asociados a los agentes biológicos y a las áreas de fondo pueden diferir en los diferentes intervalos de longitud de onda. Las técnicas de normalización pueden explotar la observación de este fenómeno para mejorar el recuento de los agentes biológicos.

- La iluminación utilizada para las primeras imágenes se encuentra dentro de un espectro visible, y la iluminación utilizada para las segundas imágenes se encuentra entre 800 nm y 900 nm. De este modo, la respuesta espectral de los medios de crecimiento biológico a lo largo de un amplio margen de longitudes de onda (tanto dentro del espectro visible como fuera del espectro visible) puede explotarse para mejorar la lectura automática de los medios de crecimiento biológico.

- La figura 1 es una vista en perspectiva de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico de ejemplo 20 capaz de ejecutar una o varias técnicas de esta descripción durante el procesamiento del medio de crecimiento biológico 24. El sistema 20 comprende una unidad de adquisición de imágenes 21 conectada a un ordenador 22. La unidad de adquisición de imágenes 21 captura las imágenes del medio de crecimiento biológico 24 en dos o más configuraciones de iluminación diferentes (p. ej., con diferentes longitudes de onda de iluminación), y el ordenador 22 procesa las imágenes para identificar y contar los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico 24. Alternativamente, se pueden utilizar filtros de color y luz blanca, u otras técnicas, para facilitar la iluminación con diferentes longitudes de onda.

- Aunque el ordenador 22 y la unidad de adquisición de imágenes 21 se ilustran como unidades independientes, las técnicas de esta descripción también podrían instalarse en un sistema o dispositivo totalmente integrado en el cual la unidad de adquisición de imágenes 21 y el ordenador 22 estén incorporados en el mismo dispositivo, a saber, un

lector biológico totalmente integrado. Además, las técnicas de esta descripción también podrían utilizarse en un sistema modular que incluya una o varias unidades de adquisición de imágenes, una o varias unidades de incubación, una o varias unidades de inoculación, uno o varios lectores de elementos de identificación (ID), etiquetadoras de ID y/u otros dispositivos que funcionen en una línea de procesamiento modular asociada a un medio de crecimiento biológico 24.

Si se desea, la unidad de adquisición de imágenes 21 puede incluir un lector de ID para leer los elementos de ID (no se muestra en la figura 1) del medio de crecimiento biológico 24. En este caso, los elementos ID pueden identificar el tipo de placa del medio de crecimiento biológico 24 y permitir que el ordenador 22 seleccione o ajuste el análisis de imagen según el tipo de placa. Además, en los elementos de ID también se puede codificar o mapear otro tipo de información. La figura 2 muestra una placa de crecimiento biológico de ejemplo que incluye un elemento de ID en forma de código de barras. La figura 2 se explica con mayor detalle a continuación.

En el ejemplo de la figura 1, el ordenador 22 puede incluir un microprocesador que ejecuta el programa informático para el análisis de imágenes del medio de crecimiento biológico 24. De acuerdo con esto, el ordenador 22 también puede incluir memoria para almacenar diferentes tipos de información, tal como los algoritmos de análisis de imágenes que ejecutan técnicas acordes con las enseñanzas de esta descripción. A modo de ejemplo, el ordenador 22 puede comprender un ordenador personal (PC), ordenador de sobremesa, ordenador portátil, miniordenador, estación de trabajo o similares. Los programas informáticos se pueden cargar en el ordenador 22 para facilitar el análisis de imágenes de las imágenes del medio de crecimiento biológico 24 generadas por la unidad de adquisición de imágenes 21.

En el ejemplo de la figura 1, la unidad de adquisición de imágenes 21 está conectada al ordenador 22 a través del puerto 25. El puerto 25, por ejemplo, puede comprender un puerto USB (*Universal Serial Bus*), un puerto USB2 (*Universal Serial Bus 2*), un puerto *FireWire* IEEE 1394, un puerto SCSI (*Small Computer System Interface*), un puerto ATA (*Advance Technology Attachment*), un puerto SATA (*serial ATA*), un puerto PCI (*Peripheral Component Interconnect*), un puerto serie o paralelo, o similares.

La unidad de adquisición de imágenes 21 está diseñada para recibir un medio de crecimiento biológico 24. En particular, la unidad de adquisición de imágenes 21 incluye una carcasa que define una ranura de entrada 28 para recibir el medio de crecimiento biológico 24. En la carcasa se puede llevar montado un mecanismo de guía 23 para ayudar a introducir el medio de crecimiento biológico 24 en la unidad de adquisición de imágenes 21. La unidad de adquisición de imágenes 21 también incluye una ranura de expulsión (no se muestra), a través de la cual se expulsa el medio de crecimiento biológico 24 después de tomar las imágenes del medio de crecimiento biológico 24. La unidad de adquisición de imágenes 21 también puede incluir otras características, tales como una pantalla de visualización (no se muestra) para mostrar a un usuario el progreso o los resultados del análisis de la placa del crecimiento biológico. No obstante, las técnicas de esta descripción podrían utilizarse con una amplia gama tipos diferentes de periféricos de adquisición de imágenes.

La unidad de adquisición de imágenes 21 aloja componentes para la adquisición de imágenes, tal como fuentes de iluminación y una o varias cámaras. En un ejemplo, la unidad de adquisición de imágenes 21 aloja una cámara monocromática bidimensional para generar una o varias imágenes monocromáticas de un medio de crecimiento biológico 24 insertado en ella. Las fuentes de iluminación de la unidad de adquisición de imágenes 21 pueden ofrecer iluminación a dos o más longitudes de onda diferentes de radiación electromagnética. Las fuentes de iluminación de la unidad de adquisición de imágenes 21 pueden iluminar el medio de crecimiento biológico 24 desde delante y/o desde detrás durante la adquisición de las imágenes. Los iluminadores pueden iluminar el medio de crecimiento biológico 24 con dos o más longitudes de onda diferentes de luz, y se pueden generar diferentes imágenes del medio de crecimiento biológico 24 con las diferentes longitudes de onda de iluminación. Puede alojarse una platina transparente dentro de la unidad de adquisición de imágenes 21 para definir una posición, respecto a la cámara, de la que adquirir la imagen del medio de crecimiento biológico 24. La unidad de adquisición de imágenes 21 puede enviar las imágenes al ordenador 22, que puede incluir un procesador para analizar las imágenes.

El medio de crecimiento biológico 24 puede incluir una región de crecimiento 27 en donde las bacterias u otros agentes se manifiestan en el medio de crecimiento biológico 24. La región de crecimiento 27 puede comprender una superficie plana, pocillos empotrados o cualquier superficie útil para el crecimiento biológico. El medio de crecimiento biológico 24 se puede fabricar para que incluya en la región de crecimiento 27 nutrientes que facilitan el crecimiento rápido de un agente biológico concreto. Se puede añadir una muestra (tal como una muestra de alimento o una muestra de laboratorio) a la región de crecimiento junto con uno o varios diluyentes, si se desea. Este procedimiento de añadir una muestra (y posiblemente un diluyente) a la región de crecimiento 27 se denomina inoculación, y puede realizarlo cualquier usuario de forma manual, o realizarlo automáticamente una unidad de inoculación (no se muestra en la figura 1). Tras la inoculación, el medio de crecimiento biológico 24 se puede incubar en una cámara o unidad de incubación (no se muestra en la figura 1).

Tras la inoculación y la incubación, el medio de crecimiento biológico 24 se procesa en la unidad de adquisición de imágenes 21 para generar imágenes de la manera que se describe en la presente memoria. En particular, la unidad de adquisición de imágenes 21 genera al menos dos imágenes diferentes a dos longitudes de onda diferentes de luz de iluminación. Las imágenes se envían desde la unidad de adquisición de imágenes 21 al ordenador 22, que realiza

el análisis de las imágenes.

Por ejemplo, la unidad de adquisición de imágenes 21 puede generar primeras imágenes con una iluminación de luz en un primer margen de longitudes de onda. Además, la unidad de adquisición de imágenes 21 puede generar segundas imágenes con iluminación de luz en un segundo intervalo de longitudes de onda. De este modo, el medio de crecimiento biológico 24 se ilumina con una o varias longitudes de onda diferentes de radiación electromagnética, y las imágenes de los medios del crecimiento biológico se capturan en la unidad de adquisición de imágenes 21 con estas diferentes iluminaciones.

En el ordenador 22, los valores de reflectancia espectral en una o varias primeras imágenes se pueden normalizar basándose en los valores de reflectancia espectral en una o varias segundas imágenes para identificar mejor los agentes biológicos que se manifiestan en los medios de crecimiento biológico. En otras palabras, el ordenador 22 utiliza las proporciones de los valores de reflectancia espectral de las primeras imágenes entre los valores de reflectancia espectral de las segundas imágenes para identificar los agentes biológicos con respecto al fondo de un medio de crecimiento biológico 24. De este modo, el ordenador 22 utiliza el análisis espectral para la detección automática de los agentes biológicos. Los valores de reflectancia espectral pueden darse como porcentajes de la reflectancia de luz a una longitud de onda concreta, y pueden estar asociados a posiciones (o regiones específicas) de píxeles específicas en las dos imágenes diferentes.

Las respuestas espectrales de los agentes biológicos y del fondo pueden diferir en márgenes de longitudes de onda diferentes. El ordenador 22 puede normalizar los valores de reflectancia de las posiciones de los píxeles de las primeras imágenes basándose en los valores de reflectancia de las posiciones de los píxeles de las segundas imágenes, mediante lo cual se mejora la capacidad del ordenador 22 para diferenciar entre el fondo del medio de crecimiento biológico 24 y los agentes biológicos que se manifiestan en el medio de crecimiento biológico 24. Los valores de reflectancia pueden representar la reflectancia espectral del medio de crecimiento biológico 24 en una posición dada con la iluminación asociada a las diferentes imágenes.

La iluminación utilizada por la unidad de adquisición de imágenes 21 para las primeras imágenes está dentro de un espectro visible y la iluminación utilizada por la unidad de adquisición de imágenes 21 para las segundas imágenes se encuentra entre 800 nm y 900 nm. De este modo, la respuesta espectral del medio de crecimiento biológico 24 a lo largo de un amplio margen de longitudes de onda (tanto dentro del espectro visible como fuera del espectro visible) se puede explotar para mejorar la lectura automática. Las imágenes pueden generarse cuando el medio de crecimiento biológico 24 está fijado en una posición para garantizar que los píxeles de las diferentes imágenes se alinean con exactitud para los propósitos de la normalización.

Una determinación de la aceptabilidad de una muestra dada que se ha de analizar en el medio de crecimiento biológico 24, en términos de recuento de colonias de bacterias o de otros agentes biológicos, puede depender del número de colonias de bacterias por región unitaria. Por consiguiente, las imágenes generadas por la unidad de adquisición de imágenes 21 pueden analizarse en el ordenador 22 y utilizarse para cuantificar la cantidad de colonias de bacterias por región unitaria en el medio de crecimiento biológico 24. Además, las técnicas de análisis espectral y de normalización descritas en la presente memoria pueden mejorar la capacidad del ordenador 22 para diferenciar entre las colonias de bacterias o de otros agentes biológicos y el fondo del medio de crecimiento biológico 24. En el análisis también se puede ponderar el tamaño de las colonias individuales, si se desea.

La figura 2 es una vista superior de un medio de crecimiento biológico de ejemplo en forma de una placa de crecimiento biológico 50. A modo de ejemplo, la placa de crecimiento biológico 50 puede comprender las placas de crecimiento biológico vendidas por 3M con el nombre comercial de placas PETRIFILM. En algunos casos, la placa de crecimiento biológico 50 puede incluir un elemento de identificación 54 para facilitar el procesamiento automático de la placa de crecimiento biológico 50.

El elemento de identificación 54 está ilustrado como un patrón que se puede leer ópticamente, p. ej., un código de barras. No obstante, en otros casos, el elemento de identificación 54 puede incluir una amplia gama de patrones ópticos tales como caracteres, códigos de barras, códigos de barras bidimensionales, rejillas ópticas, hologramas, tintas fosforescentes y similares. Además, en algunas realizaciones, el elemento de identificación 54 puede comprender circuitos, o elementos magnéticos, visibles o invisibles que pueden ser legibles mediante técnicas de radiofrecuencia o magnéticas. Por ejemplo, el elemento de identificación 54 puede comprender una cualquiera entre una amplia gama de etiquetas de identificación por radiofrecuencia (IDRF) utilizadas habitualmente en muchas industrias para el seguimiento del inventario.

La placa de crecimiento biológico 50 puede facilitar el crecimiento rápido y la detección y el recuento de las bacterias o de otros agentes biológicos, entre ellos, por ejemplo, bacterias aerobias, *E. coli*, coliformes, *Enterobacteriaceae*, levaduras, mohos, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Campylobacter*, y similares. El uso de las placas PETRIFILM, u otros medios de crecimiento, puede simplificar el análisis de las bacterias en las muestras de alimentos.

Tal y como se muestra en la figura 2, la placa de crecimiento biológico 50 define una región de crecimiento 52. Una determinación de la aceptabilidad de una muestra dada que se ha de analizar en la placa 50, en términos de recuento de colonias de bacterias, puede depender del número de colonias de bacterias por región unitaria. Por

consiguiente, de acuerdo con esta descripción, un sistema automático puede procesar la placa de crecimiento biológico 50 para cuantificar la cantidad de colonias de bacterias por región unitaria en las placas 50 y puede comparar la cantidad, o «recuento», con un umbral. El umbral puede representar, por ejemplo, un recuento de colonias que está relacionado con un número aceptable (o inaceptable) de microorganismos en la muestra original.

- 5 La superficie de la placa de crecimiento biológico 50 puede contener uno o varios agentes estimuladores del crecimiento diseñados para facilitar el crecimiento rápido de uno o varios tipos de bacterias o de otros agentes biológicos.

La placa de crecimiento biológico 50 se puede inocular con una muestra. La inoculación se refiere al procedimiento de añadir dentro de la región de crecimiento 52 de la superficie de la placa de crecimiento biológico 50 una muestra de material que hay que analizar, posiblemente con un diluyente. La inoculación puede realizarse de forma manual o de forma automática. Tras la inoculación, la placa de crecimiento biológico 50 puede introducirse en una cámara de incubación (no se muestra). En la cámara de incubación, los microorganismos tales como bacterias, levaduras o mohos crecen en los nutrientes de la placa de crecimiento biológico 50 y, tras un intervalo de tiempo, se manifiestan por sí solos como colonias. Las colonias (p. ej., de moho o de otros microorganismos), representados por diferentes puntos en la placa de crecimiento biológico 50 de la figura 2, pueden presentarse de diferentes colores respecto a los colores de fondo de la región de crecimiento 52, lo que facilita la detección automática y el recuento de las colonias bacterianas mediante las técnicas de análisis de imágenes. En particular, la región 58 asociada a un agente biológico puede aparecer diferente a la región 56 asociada a un fondo de la placa de crecimiento biológico 50, en particular en el espectro visible.

- 20 Tal y como se describe en esta descripción, se generan dos o varias imágenes diferentes de la placa de crecimiento biológico 50. Se pueden generar una o varias primeras imágenes con iluminación mediante radiación electromagnética a una primera longitud de onda, p. ej., luz dentro del espectro visible. Se pueden generar una o varias segundas imágenes con iluminación mediante radiación electromagnética a una segunda longitud de onda, que se encuentra entre 800 nm y 900 nm. La proporción de la reflectancia espectral de cada una de las posiciones de píxeles de la segunda imagen respecto a las correspondientes posiciones de los píxeles de la primera imagen puede ayudar a detectar la región 58 asociada a un agente biológico respecto a una región 56 asociada al fondo. Las comparaciones por regiones de la región 58 respecto a la región 56, o posiblemente las proporciones de los píxeles para cada posición de píxeles, se pueden utilizar para determinar si la región 58 (o los píxeles dentro de la región 58) realmente corresponde a una colonia de bacterias que ha crecido en la placa de crecimiento biológico 50.
- 30 En otras palabras, un ordenador puede calcular la proporción de los valores de reflectancia de las primeras imágenes respecto a las segundas imágenes en la región 58, y la proporción de los valores de reflectancia de las primeras imágenes respecto a las segundas imágenes en la región 56. Estas proporciones pueden conseguir una distinción más nítida entre las regiones 58 y 56 de lo que se podría definir a partir de una única serie de imágenes. El procedimiento de definición de estas proporciones se denomina normalización de las primeras imágenes basándose en las segundas imágenes. Tal normalización puede mejorar la capacidad de identificación de los agentes biológicos asociados a la región 58 respecto al fondo asociado a la región 56. Por ejemplo, en cada posición de píxeles (o posiblemente para conjuntos de píxeles dentro de regiones diferentes), las proporciones generadas para normalizar las primeras imágenes se pueden comparar con un umbral para determinar si dicha posición corresponde a un agente biológico o al fondo. A las proporciones calculadas para cada posición de píxeles (o en diferentes áreas definidas por conjuntos de posiciones de píxeles) también se les podrían aplicar otras reglas o técnicas de recuento más complicadas. Los valores de reflectancia se pueden medir en cualquier tipo de unidades y, en algunos casos, pueden comprender valores porcentuales adimensionales.

La figura 3 es un diagrama de bloques de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico 30, que puede corresponder al sistema 20 de la figura 1 o a otro sistema, tal como un lector biológico completamente integrado o un sistema modular. El sistema 30 incluye un ordenador 32, que puede incluir un procesador 33 conectado a la memoria 36. Si se desea, el ordenador 32 puede estar conectado a un periférico de salida 38, tal como una pantalla de visualización. El ordenador 32 también puede estar conectado a otras unidades de procesamiento (no se muestran) tales como unidades de inoculación, unidades de incubación, lectores de ID, periféricos de etiquetado o similares.

- 50 La unidad de adquisición de imágenes 31 está conectada al ordenador 32. La unidad de adquisición de imágenes 31 genera una o varias imágenes de un medio de crecimiento biológico y envía las imágenes al ordenador 32. El procesador 33 procesa las imágenes basándose en los algoritmos de análisis de imágenes incluidos en la memoria 36. Por ejemplo, la memoria 36 puede incluir una serie de instrucciones informáticas ejecutables por el procesador que facilitan el análisis de imágenes de las imágenes generadas por la unidad de adquisición de imágenes 31. El procesador 33 ejecuta tales instrucciones para llevar a cabo las técnicas de esta descripción. El periférico de salida 38 recibe los resultados determinados por el procesador 33 y ofrece los resultados a un usuario.

La memoria 36 también puede incluir una base de datos 40, así como programas informáticos de gestión de bases de datos para la gestión de la base de datos 40. La base de datos 40 de la memoria 36 se puede utilizar para asociar los diferentes tipos de información a diferentes medios de crecimiento biológico. De igual forma, la base de datos 40 puede utilizarse para almacenar los perfiles espectrales asociados a diferentes tipos de placas de crecimiento biológico. Tales perfiles espectrales, por ejemplo, se pueden utilizar para el procesamiento de placas de

crecimiento biológico y pueden posiblemente ayudar a diferenciar la región 58 (figura 2) asociada a un agente biológico con respecto a la región 56 asociada a un fondo. Para generar tales perfiles espectrales, la respuesta de reflectancia de los medios de crecimiento biológico de ejemplo puede recogerse mediante un espectrómetro. La base de datos 40 almacenaría los perfiles espectrales de una amplia gama tipos de medios de crecimiento biológico diferentes, y la base de datos 40 se actualizaría de vez en cuando con los perfiles espectrales asociados a los nuevos tipos de los medios de crecimiento biológico.

Más específicamente, los perfiles espectrales asociados a las placas de crecimiento biológico pueden ayudar a determinar si existen errores o defectos en los medios de crecimiento biológico. Los perfiles espectrales pueden compararse con los datos medidos en el medio de crecimiento biológico para identificar los defectos de fabricación o el mal uso que hacen que los medios de crecimiento biológico se vuelvan imprecisos. En este caso, si la medición de los valores de reflectancia asociados a un medio de crecimiento biológico se desvían demasiado de la respuesta espectral esperada, se podría señalar que este medio es posible que contenga errores. Tales errores pueden deberse, por ejemplo, al envejecimiento, a defectos de fabricación o al uso indebido por el técnico de laboratorio o por otro usuario. Por ejemplo, la inoculación inadecuada o excesiva en un medio de crecimiento biológico puede ocasionar que el medio de crecimiento biológico se haya llenado en exceso de inóculo, lo que posiblemente provoque errores que se pueden detectar mediante la comparación de la medición de los valores de reflectancia frente a los perfiles espectrales esperados que están asociados a los medios biológicos.

Cada tipo de placa de crecimiento biológico puede definir una firma espectral única. Si los valores de reflectancia medidos en una o varias regiones no cuadran con los valores esperados, como está definido por la firma espectral única, se puede indicar que el medio podría incluir errores. De este modo, los medios de crecimiento biológico pueden procesarse basándose en los perfiles espectrales para mejorar la integridad del análisis automático de los medios de crecimiento biológico. Los perfiles espectrales podrían utilizarse con otros fines, además de para comprobar errores manifiestos debidos a envejecimiento, a defectos de fabricación o a inoculación inadecuada.

La figura 4 es un gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a las diferentes posiciones de un medio de crecimiento biológico. El gráfico de la figura 4 representa una ilustración grosso modo de los datos recogidos de un experimento realizado con respecto a una placa de recuento de mohos y levaduras PETRIFILM, de ahora en adelante, denominada «placa PETRIFILM YM», que se puede adquirir comercialmente a la compañía 3M de Saint Paul, Minnesota. La placa PETRIFILM YM se inoculó con moho (cepa M6) y se incubó de acuerdo con las especificaciones de la placa PETRIFILM YM. Se utilizó un espectrómetro del modelo número USB4000 de Ocean Optics para medir la reflectancia de la placa PETRIFILM YM con una fuente de luz halógena.

Se identificaron cinco posiciones diferentes de la placa PETRIFILM YM para comparar las respuestas espectrales a diferentes longitudes de onda. La línea 41 corresponde a la respuesta espectral asociada a una posición del borde del fondo (esto es, una primera posición del fondo) en la placa PETRIFILM YM. La línea 42 corresponde a la respuesta espectral asociada a un agente biológico (esto es, un primer agente) que se forma en la placa PETRIFILM YM. La línea 43 corresponde a la respuesta espectral asociada a una posición del fondo que no es del borde (esto es, una segunda posición del fondo) en la placa PETRIFILM YM. La línea 44 corresponde a la respuesta espectral asociada a otra posición del fondo que no es del borde (esto es, una tercera posición del fondo) en la placa PETRIFILM YM. La línea 45 corresponde a la respuesta espectral asociada a otro agente biológico (esto es, un segundo agente) formado en la placa PETRIFILM YM.

Tal y como podemos ver en la figura 4, la información espectral en el espectro visible entre 400 nm y 700 nm, y específicamente entre 500 nm y 700 nm, lleva sustancialmente toda la información que diferencia entre las líneas 42 y 45 (que corresponden a los agentes biológicos) y las líneas 41, 43 y 44 (que corresponden a las diferentes posiciones del fondo). Además, la línea 42 muestra menos reflectancia que las líneas 43 y 44 en una parte sustancial del espectro visible, pero muestra más reflectancia que las líneas 43 y 44 a las longitudes de onda por encima de 700 nm. A longitudes de onda entre 800 y 900 nm, todas las líneas son aproximadamente paralelas.

Estas observaciones permiten utilizar las técnicas de normalización. Por ejemplo, la reflectancia espectral medida a longitudes de onda entre 800 y 900 nm se puede utilizar para normalizar la reflectancia espectral medida en el espectro visible entre 400 y 700 nm. Las características espectrales esperadas o medidas del medio de crecimiento biológico en los diferentes márgenes pueden explotarse con la captura de primeras imágenes de un medio de crecimiento biológico con iluminación a longitudes de onda en el espectro visible (p. ej., entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 700 nm) y con la captura de segundas imágenes de un medio de crecimiento biológico con iluminación a longitudes de onda de fuera del espectro visible (p. ej., entre aproximadamente 800 nm y aproximadamente 900 nm).

La figura 5 es un diagrama de bloques que ilustra la iluminación de un medio de crecimiento biológico 115 dentro de un periférico de iluminación, tal como la unidad de adquisición de imágenes 21 de la figura 1. El periférico de iluminación incluye las fuentes de iluminación 110A, 110B y 110C (denominadas en conjunto fuentes de iluminación 110). El periférico de iluminación también incluye una cámara 112, que puede comprender una cámara monocromática bidimensional u otro tipo de cámara. El medio de crecimiento biológico 115 estaría sujeto en una posición de adquisición de imágenes respecto a la cámara 112. El medio de crecimiento biológico 115 descansaría sobre una platina transparente 114, o podría mantenerse en su lugar mediante mecanismos de guía, pinzas u otros

elementos con o sin la necesidad de la platina 114.

Las fuentes de iluminación 110 iluminan el medio de crecimiento biológico 115 con dos o más longitudes de onda diferentes de radiación electromagnética, y la cámara 112 captura una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico 115 en cada una de estas diferentes iluminaciones. En particular, la cámara 112 puede capturar primeras imágenes del medio de crecimiento biológico 115 con iluminación por las fuentes de iluminación 110 con radiación electromagnética a una primera longitud de onda, p. ej., luz dentro del espectro visible. La cámara 112 puede capturar segundas imágenes del medio de crecimiento biológico 115 con iluminación por las fuentes de iluminación 110 con radiación electromagnética a una segunda longitud de onda, p. ej., luz de fuera del espectro visible. Las primeras y segundas imágenes se pueden capturar cuando el medio de crecimiento biológico 115 está sujeto en una posición fija respecto a la cámara 112 para garantizar que los píxeles de las primeras imágenes corresponden a los píxeles de las segundas imágenes. A continuación, estas imágenes se envían desde la cámara 112 a un ordenador para el análisis.

El ordenador (no se muestra en la figura 4) puede analizar las imágenes y crear proporciones para cada posición de píxeles para normalizar los valores de reflectancia de las primeras imágenes. En particular, la proporción de los valores de reflectancia espectral de una segunda imagen respecto a una primera imagen puede ayudar a detectar las regiones del medio de crecimiento biológico 115 asociadas a agentes biológicos con respecto a las regiones del medio de crecimiento biológico 115 asociadas a un fondo.

Las fuentes de iluminación 110 pueden comprender cualquiera de una amplia gama de dispositivos o configuraciones. Las fuentes de iluminación 110 pueden comprender fuentes de luz fluorescente con filtros para definir las longitudes de onda de iluminación adecuadas. Alternativamente, las fuentes de iluminación 110 pueden comprender fuentes de luz mediante semiconductores, tales como diodos emisores de luz. Los diodos emisores de luz, por ejemplo, pueden definirse para crear las longitudes de onda de iluminación, o pueden utilizarse filtros con este fin. También podrían utilizarse muchos otros tipos de fuentes de iluminación. Aunque en la figura 5 se muestran las fuentes de iluminación 110 colocadas del lado frontal y trasero del medio de crecimiento biológico 115, en algunos casos podría utilizarse la iluminación únicamente desde un lado del medio de crecimiento biológico 115. De hecho, podría utilizarse una amplia gama de configuraciones para conseguir dos márgenes de longitudes de onda diferentes de iluminación acordes con esta descripción.

En un ejemplo, la fuente de iluminación 110A genera la iluminación a la primera longitud de onda y la fuente de iluminación 110B genera la iluminación a la segunda longitud de onda. La fuente de iluminación 110C puede proporcionar iluminación de contraluz a las dos diferentes longitudes de onda. En otros casos, cada una de las fuentes de iluminación 110 puede incluir elementos capaces de iluminar a la primera y segunda longitudes de onda. Puede utilizarse cualquier número de márgenes de longitudes de onda diferentes para definir las imágenes a varias longitudes de onda diferentes de iluminación. Después de capturar las imágenes, la cámara 112 envía las imágenes a un ordenador para el análisis de imágenes acorde con esta descripción. De nuevo, la primera y segunda imágenes pueden capturarse cuando el medio de crecimiento biológico 115 se mantiene en una posición fija respecto a la cámara 112 para garantizar que los píxeles de las primeras imágenes corresponden a los píxeles de las segundas imágenes.

En otra realización, puede utilizarse iluminación de luz blanca con filtros ópticos, bien estáticos o bien en una rueda de filtros. De igual forma, en otra realización, puede utilizarse la iluminación de luz blanca con los filtros ópticos insertados en el sensor de imágenes en forma de una matriz de máscaras, p. ej., similar a una máscara Bayer. En cualquier caso, los valores de reflectancia de las posiciones de los píxeles en una primera imagen espectral se puede normalizar basándose en los valores de reflectancia para las mismas posiciones espaciales de píxeles en una o varias segundas imágenes espectrales. La primera imagen puede asociarse a una longitud de onda de iluminación diferente de la una o varias segundas imágenes. También pueden utilizarse otras imágenes más a diferentes longitudes de onda de iluminación.

La figura 6 es un gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a un elemento formado en un medio de crecimiento biológico y la respuesta espectral asociada a una región de fondo del medio de crecimiento biológico. En la figura 6, la línea 64 corresponde a la línea 44 de la figura 4 y la línea 65 corresponde a la línea 45 de la figura 4. Las ventanas 66A y 66B pueden definir los márgenes de longitudes de onda de iluminación utilizados para capturar las primeras imágenes y las segundas imágenes, respectivamente. Para cada una de las imágenes, puede determinarse la intensidad de cada posición de píxeles, y puede determinarse una proporción de las intensidades de las ventanas 66A (asociada a una primera imagen espectral) y 66B (asociada a una segunda imagen espectral). Este procesamiento se puede considerar que normaliza los valores de reflectancia de las primeras imágenes asociadas a la ventana 66A basándose en las segundas imágenes asociadas a la ventana 66B. Tal normalización mediante el uso de proporciones puede mejorar la capacidad para detectar si cada píxel dado está asociado a un fondo o a un agente biológico. Además, si se desea, se puede programar en un ordenador el perfil espectral esperado que está asociado a los fondos y a los agentes, y utilizarlo para mejorar el análisis al proveer los valores esperados o las proporciones esperadas para los píxeles del fondo y para los píxeles asociados a los agentes biológicos. De este modo, los perfiles espectrales esperados pueden ayudar a identificar los agentes biológicos. Tal y como se ha señalado, los perfiles espectrales esperados también pueden utilizarse para el control de calidad y la detección de los posibles errores debidos al envejecimiento, a defectos de fabricación o a la inoculación inadecuada.

Las técnicas de esta descripción podrían mejorar significativamente la capacidad de diferenciar entre el fondo y los agentes biológicos. Incluso aunque las diferencias absolutas entre la reflectancia del fondo y de los elementos biológicos en las imágenes generadas con la primera iluminación no son significativas, las diferencias normalizadas pueden ser significativas. En consonancia, las técnicas de normalización de esta descripción podrían conseguir

5 mejorar la capacidad de diferenciación o de distinción entre las regiones de fondo y los agentes biológicos que se forman en el medio de crecimiento biológico. En cada posición de píxeles (o posiblemente para conjuntos de píxeles dentro de regiones diferentes), las proporciones generadas para normalizar las primeras imágenes se pueden comparar con un umbral para determinar si esa posición corresponde a un agente biológico o a fondo. A las

10 proporciones calculadas en cada posición de píxeles (o en diferentes regiones definidas por conjuntos de posiciones de píxeles) también se les podrían aplicar otras reglas o técnicas de recuento más complicadas.

La figura 7 es otro gráfico que ilustra la respuesta espectral asociada a un elemento formado en un medio de crecimiento biológico y la respuesta espectral asociada a una región de fondo en el medio de crecimiento biológico. En la figura 7, la línea 74 corresponde a la línea 44 de la figura 4 y la línea 72 corresponde a la línea 42 de la figura 4. Las ventanas 76A y 76B podrían definir la iluminación utilizada para capturar las primeras imágenes y las

15 segundas imágenes, respectivamente. Para cada una de las imágenes puede determinarse la intensidad de cada posición de píxel y puede determinarse una proporción de las intensidades en las ventanas 76A y 76B. Este procesamiento puede verse como que normaliza los valores de reflectancia espectral de las primeras imágenes asociadas a la ventana 76A basándose en los valores de reflectancia espectral de las segundas imágenes asociadas a la ventana 76B. Las proporciones pueden compararse entonces con uno o varios umbrales para

20 determinar si las posiciones de los píxeles corresponden a los agentes biológicos o al fondo.

Al igual que con el ejemplo de la figura 6, esta normalización mediante el uso de las proporciones puede mejorar la capacidad para detectar si cada píxel dado está asociado a un fondo o a un agente biológico. De nuevo, si se desea, puede programarse en el ordenador el perfil espectral esperado que está asociado a los fondos y a los agentes, y utilizarlo para mejorar el análisis al proporcionar los valores esperados o las proporciones esperadas de los píxeles

25 del fondo y de los píxeles asociados a los agentes biológicos.

En el ejemplo de la figura 7, la capacidad para diferenciar entre el fondo (asociado a la línea 74) y los agentes biológicos (asociados a la línea 72) puede mejorarse significativamente con respecto a una comparación absoluta de los valores de un único margen de frecuencias (p. ej., definido mediante la primera ventana 76A). En este caso, incluso aunque las diferencias absolutas entre la reflectancia del fondo y de los agentes biológicos en la ventana

30 76A para las imágenes generadas con la primera iluminación sean sólo de aproximadamente el 15%, las diferencias normalizadas pueden ser de más del 30%. En consonancia, en el ejemplo de la figura 7, el uso de las técnicas o de las proporciones de normalización tal y como se describen en la presente memoria, puede producir mejoras de más del 100% a la hora de cuantificar las diferencias de los píxeles asociados a un agente biológico con respecto a los píxeles del fondo.

La figura 8 es un diagrama de flujo que ilustra una técnica acorde con esta descripción. Tal y como se muestra en la figura 8, la unidad de adquisición de imágenes 21 ilumina el medio de crecimiento biológico 24 con la primera radiación electromagnética (tal y como se muestra en la etapa 81), y genera una o varias primeras imágenes del medio de crecimiento biológico 24 iluminado con la primera radiación electromagnética (tal y como se muestra en la etapa 82). La unidad de adquisición de imágenes 21 también ilumina el medio de crecimiento biológico 24 con la

40 segunda radiación electromagnética (tal y como se muestra en la etapa 83) y genera una o varias segundas imágenes del medio de crecimiento biológico iluminado con la segunda radiación electromagnética (tal y como se muestra en la etapa 84). Las imágenes generadas pueden enviarse al ordenador 22 para el análisis de imágenes.

El ordenador 22 cuenta los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico 24 basándose en las primeras y en las segundas imágenes. En particular, el ordenador 22 normaliza los valores de reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes (tal y como se muestra en la etapa 85), identifica los agentes biológicos basándose en los valores normalizados de la reflectancia espectral (tal y como se muestra en la etapa 86) y cuenta los agentes biológicos que se han identificado (tal y como se muestra en la etapa 87). Dicho de otro modo, el ordenador 22 determina las proporciones de los valores de reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes entre los valores de reflectancia espectral de la una o varias segundas imágenes,

50 identifica los agentes biológicos basándose en las proporciones y cuenta los agentes biológicos que se han identificado.

La primera radiación electromagnética puede estar dentro de un espectro visible, y la segunda radiación electromagnética puede estar fuera del espectro visible. Por ejemplo, la primera radiación electromagnética puede comprender luz que tiene una longitud de onda entre aproximadamente 500 nm y 700 nm, y la segunda radiación electromagnética puede comprender luz que tiene una longitud de onda entre aproximadamente 800 nm y 900 nm. Si se desea, el ordenador 22 puede almacenar un perfil espectral asociado al medio de crecimiento biológico, en cuyo caso la identificación de los agentes biológicos en el medio de crecimiento biológico 24 puede basarse en las primeras y segundas imágenes y en el perfil espectral guardado. Otra posibilidad es que los perfiles espectrales almacenados pueden utilizarse para procesar el medio de crecimiento biológico, lo que posiblemente proporciona

60 una comprobación de calidad del medio de crecimiento biológico. El ordenador 22 puede actualizarse con nuevos perfiles espectrales, a medida que se desarrollan nuevos tipos de placas de crecimiento biológico.

La figura 9 es otro diagrama de flujo que ilustra una técnica acorde con esta descripción. Tal y como se muestra en la figura 9, la unidad de adquisición de imágenes 21 ilumina el medio de crecimiento biológico 24 con radiación electromagnética de fuera del espectro visible (tal y como se muestra en la etapa 91), y genera una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico 24 iluminado con la radiación electromagnética de fuera del espectro visible (tal y como se muestra en la etapa 92). Las imágenes generadas pueden enviarse a un ordenador 22 para el análisis de imágenes, y el ordenador 22 puede contar los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico 24 basándose en la una o varias imágenes (tal y como se muestra en la etapa 93).

De nuevo, la radiación electromagnética que está fuera del espectro visible puede comprender luz que tiene una longitud de onda entre aproximadamente 700 nm y aproximadamente 1000 nm, y más específicamente entre aproximadamente 800 nm y aproximadamente 900 nm. También se pueden generar las imágenes dentro del espectro visible, en cuyo caso el ordenador 22 puede contar los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico 24 basándose en una o varias primeras imágenes asociadas a la iluminación en el espectro visible, y en una o varias segundas imágenes asociadas a la iluminación de fuera del espectro visible.

Las técnicas descritas en la presente memoria pueden ser objeto de una amplia gama de modificaciones y detalles específicos de instalación. Por ejemplo, el uso de imágenes generadas con luz de fuera del espectro visible puede tener otras aplicaciones, tales como con los medios de crecimiento biológico diseñados para manifestar la información espectral en longitudes de onda de fuera del espectro visible. Además, aunque se han descrito sistemas específicos de ejemplo, las técnicas de esta descripción podrían utilizarse en otros tipos de sistemas o dispositivos, tal como los sistemas modulares de procesamiento de medios de crecimiento biológico, o lectores biológicos totalmente integrados que incluyen las capacidades de adquisición de imágenes y de procesamiento de imágenes.

Las técnicas descritas en la presente memoria pueden instalarse en equipos informáticos (*hardware*), programas informáticos (*software*), microcódigo informático (*firmware*) o cualquier combinación de los mismos. Si se instalan en programas informáticos, las técnicas pueden llevarse a cabo, al menos en parte, en un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, cuando se ejecutan en el ordenador de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico, hacen que el ordenador realice una o varias de las técnicas de esta descripción. El medio de almacenamiento de datos legible por ordenador puede formar parte de un producto en forma de programa informático, que puede incluir materiales de envasado. El medio legible por ordenador puede comprender la memoria de acceso aleatorio (RAM, por su nombre en inglés) tal como la memoria dinámica y sincronizada de acceso aleatorio (SDRAM, por su nombre en inglés), memoria de sólo lectura (ROM, por su nombre en inglés), memoria no volátil de acceso aleatorio (NVRAM, por su nombre en inglés), memoria de sólo lectura programable y borrrable eléctricamente (EEPROM, por su nombre en inglés), memoria FLASH, medios de almacenamiento de datos ópticos o magnéticos, y similares.

Las instrucciones legibles por ordenador se pueden ejecutar en el ordenador del sistema gracias a uno o más procesadores, microprocesadores de uso general, ASIC, FPGA, u otro circuito lógico aislado o integrado equivalente. Por consiguiente, la terminología «procesador», tal y como se utiliza en la presente memoria, puede referirse a cualquier estructura adecuada para la instalación de las técnicas descritas en la presente memoria.

De igual forma se describe un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, tras su ejecución en un ordenador de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico, hacen que el ordenador reciba una o varias imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la radiación electromagnética de fuera del espectro visible, y cuente los agentes biológicos del medio de crecimiento biológico basándose en la una o varias imágenes.

Además, esta descripción puede dar a conocer un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, tras su ejecución en un ordenador de un sistema de procesamiento de medios de crecimiento biológico, hacen que el ordenador reciba una o varias primeras imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias primeras imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la primera radiación electromagnética, reciba una o varias segundas imágenes del medio de crecimiento biológico, en donde la una o varias segundas imágenes se han generado durante la iluminación del medio de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética, normaliza los valores de reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes, y cuenta los agentes biológicos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral.

Si se instala en el equipo informático, esta descripción se puede referir a un circuito, tal como un circuito integrado, ASIC, FPGA, lógico o diferentes combinaciones de los mismos, configurado para que realice una o varias de las técnicas descritas en la presente memoria. Se pueden hacer diferentes modificaciones sin alejarse del alcance de la invención. Éstas y otras realizaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones que vienen a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Método que comprende:

iluminar la placa de crecimiento biológico con la primera radiación electromagnética, que se encuentra dentro del espectro visible;

5 utilizar un dispositivo de adquisición de imágenes para generar una o varias primeras imágenes de la placa de crecimiento biológico iluminada con la primera radiación electromagnética;

iluminar la placa de crecimiento biológico con la segunda radiación electromagnética, que se encuentra entre 800 nm y 900 nm;

10 utilizar el dispositivo de adquisición de imágenes para generar una o varias segundas imágenes de la placa de crecimiento biológico iluminada con la segunda radiación electromagnética;

normalizar los valores de reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes basándose en la una o varias segundas imágenes;

identificar las colonias de microorganismos basándose en los valores normalizados de reflectancia espectral; y

contar las colonias de microorganismos que se han identificado.

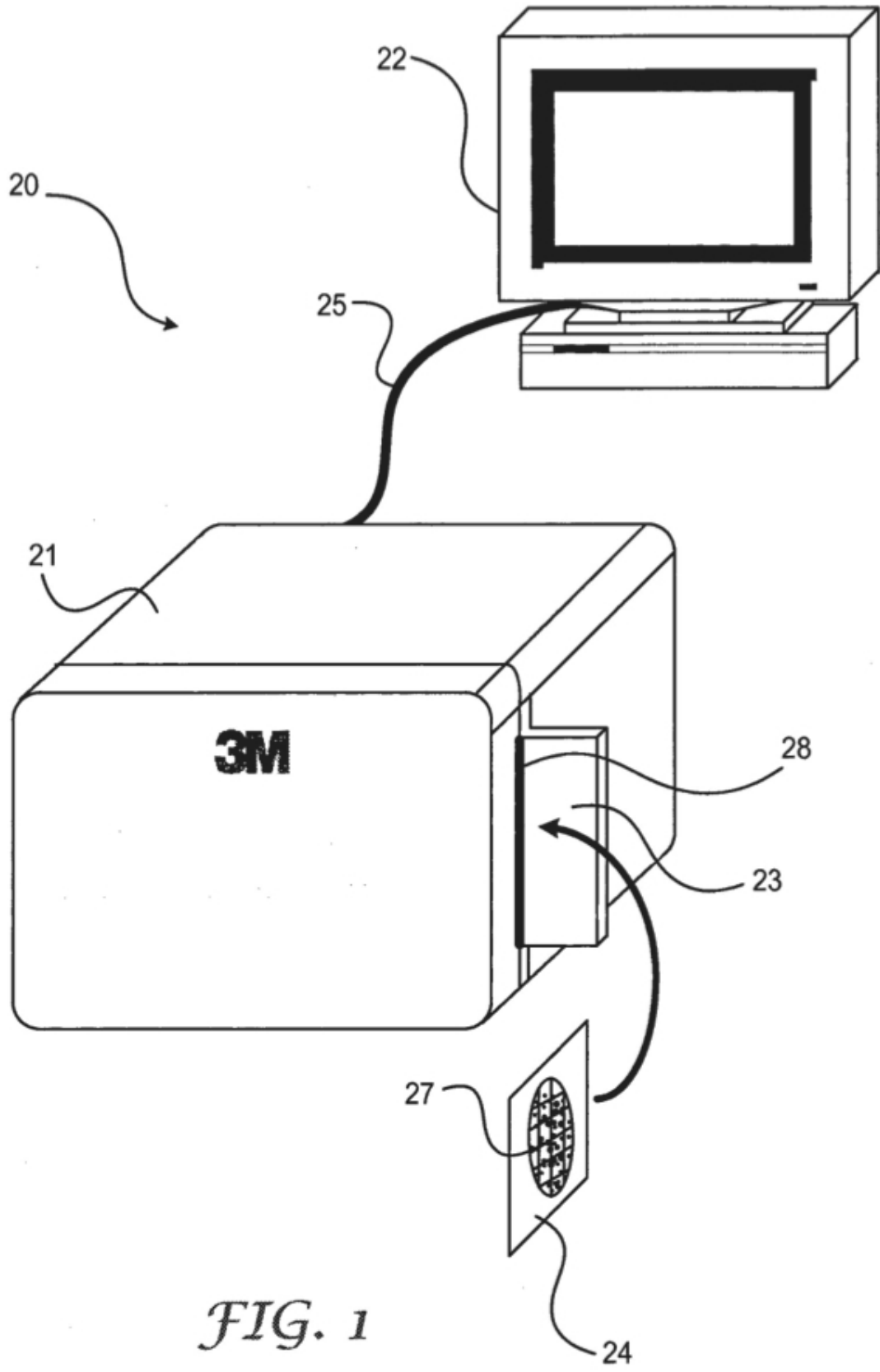
15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:

determinar las proporciones entre reflectancia espectral de la una o varias primeras imágenes y la reflectancia espectral de la una o varias segundas imágenes;

identificar las colonias de microorganismos basándose en las proporciones; y

contar las colonias de microorganismos que se han identificado.

20



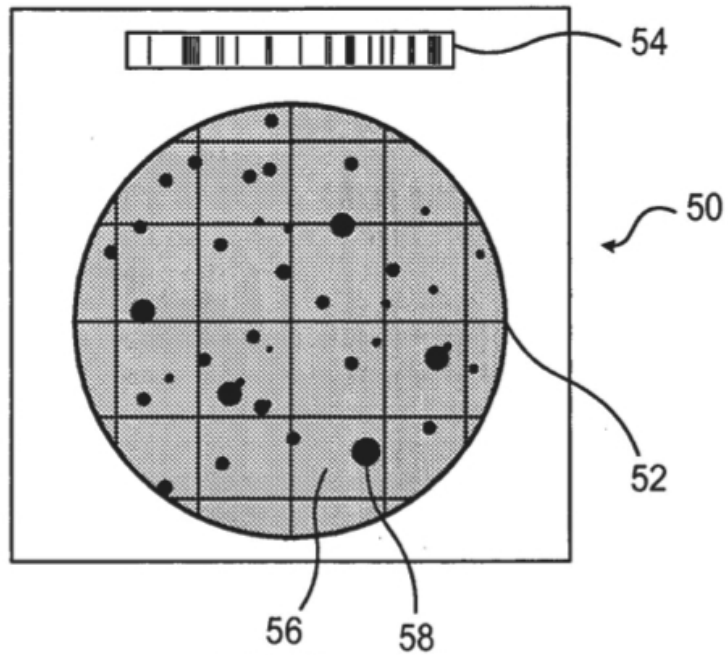


FIG. 2

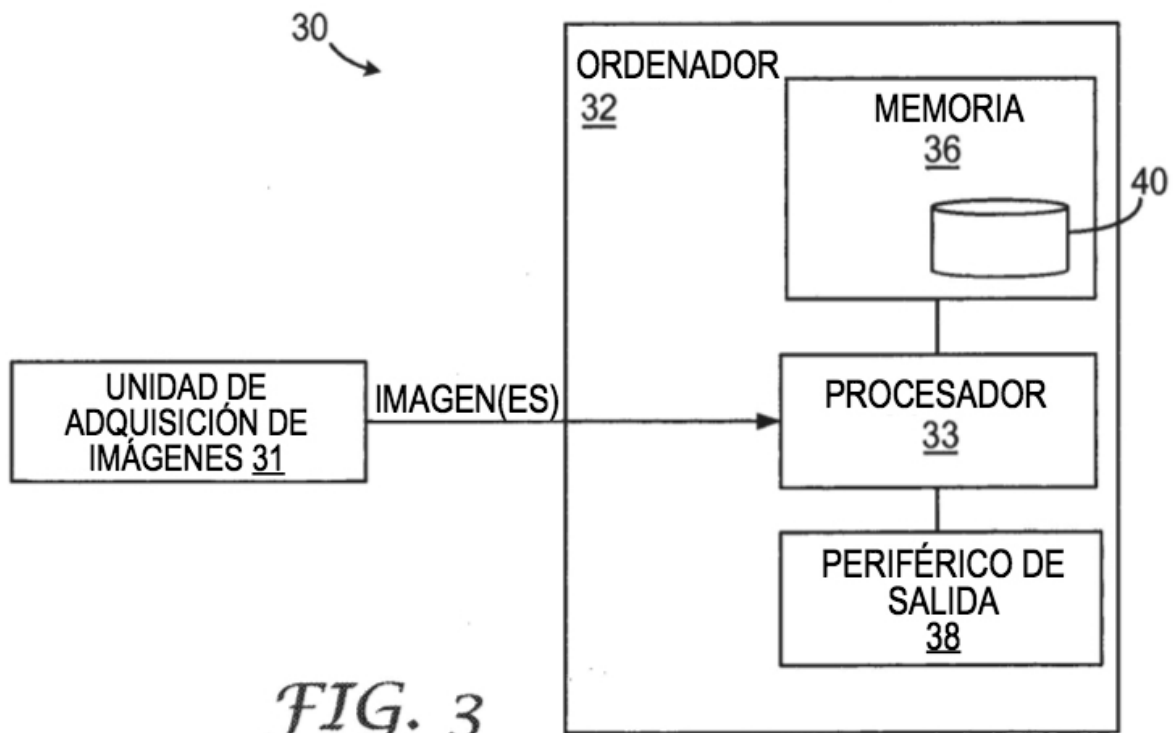


FIG. 3

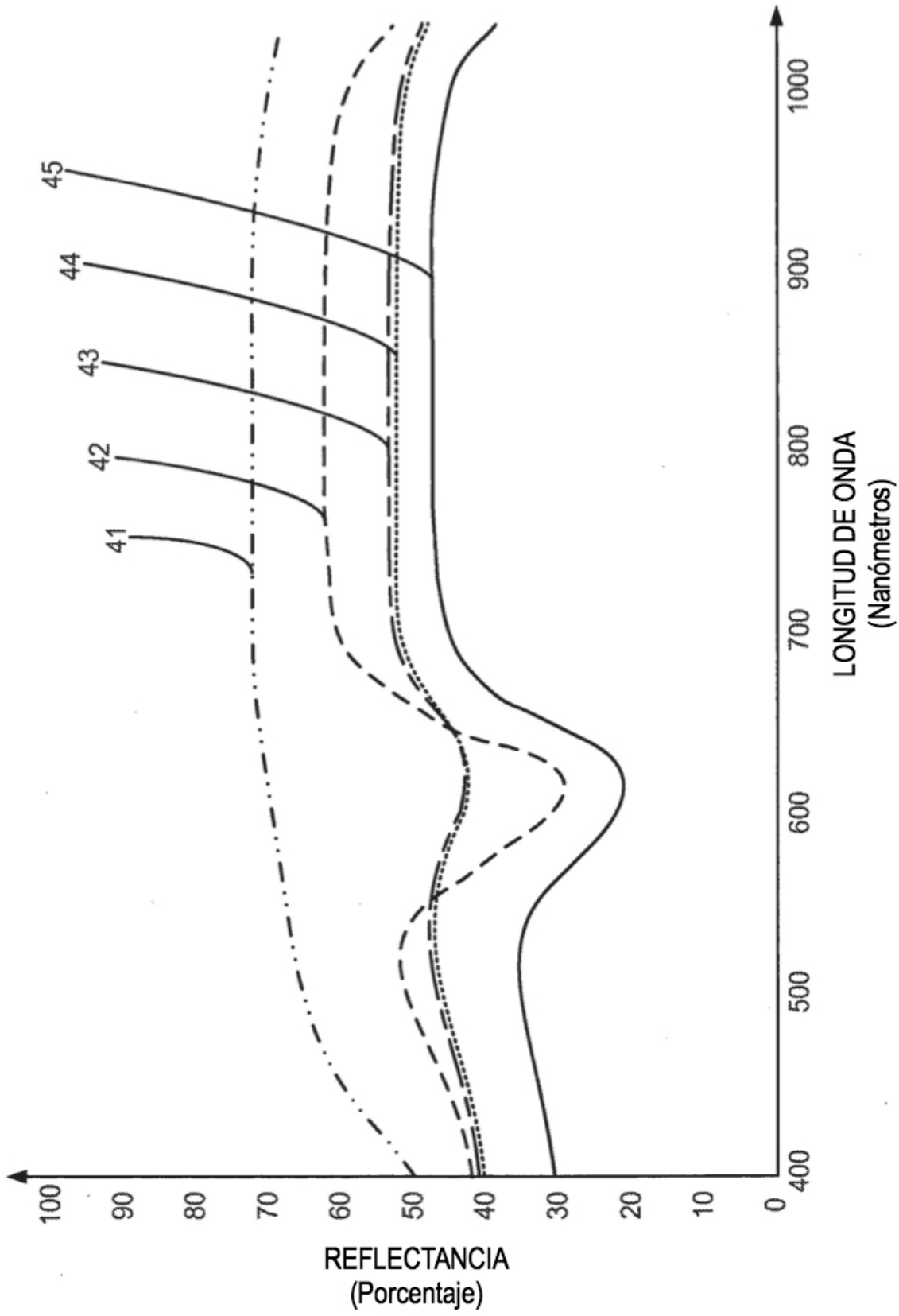


FIG. 4

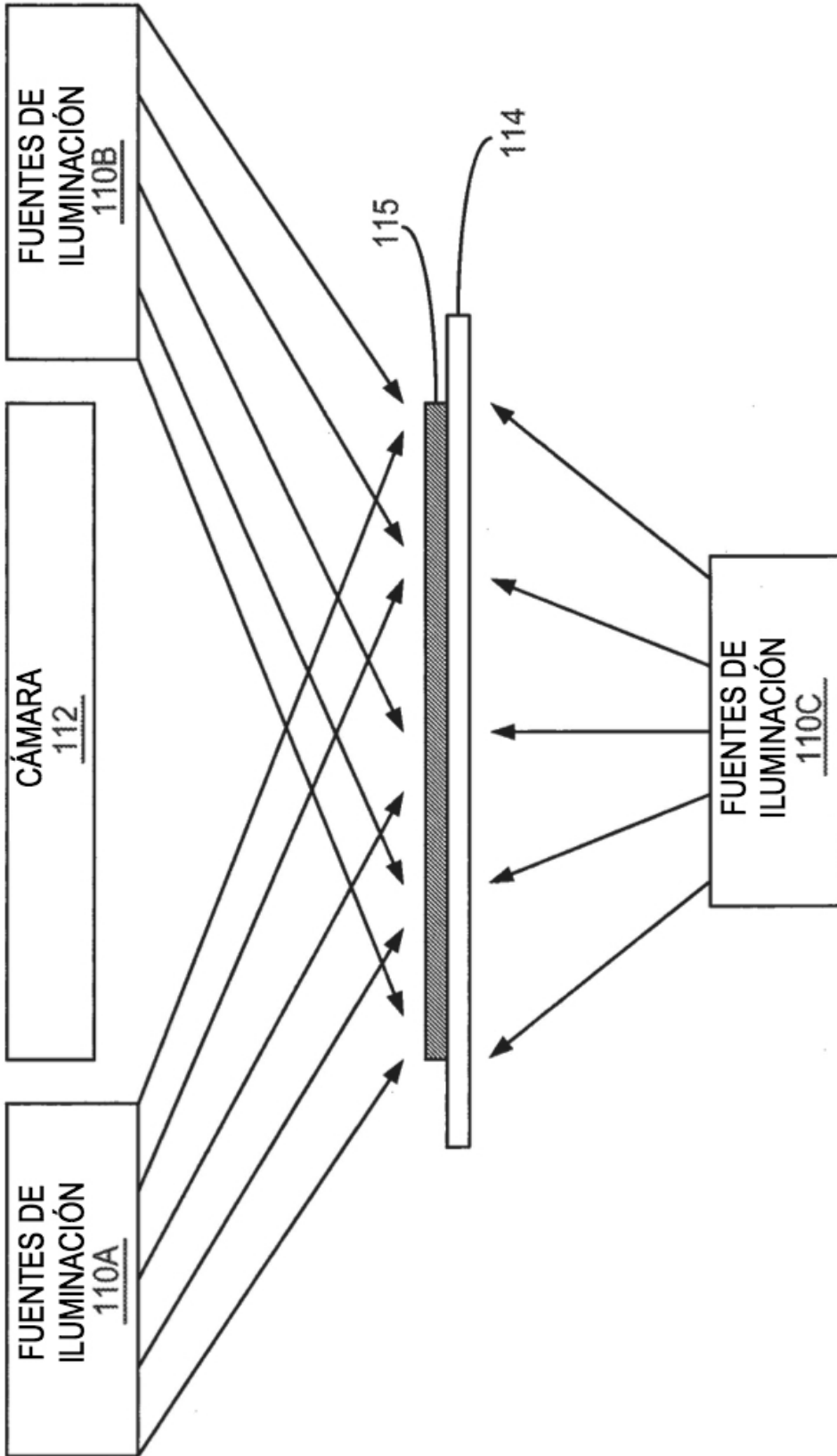


FIG. 5

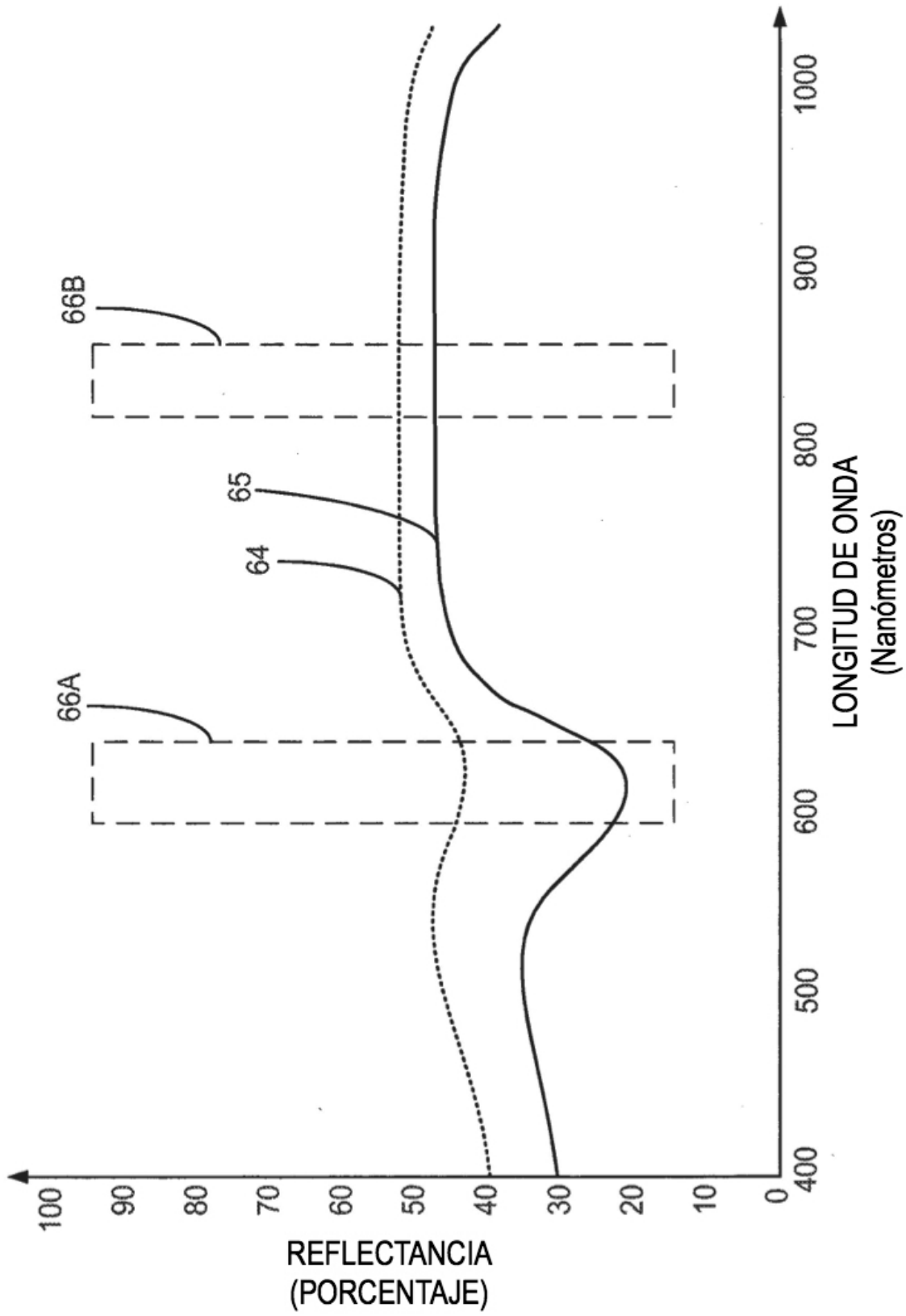


FIG. 6

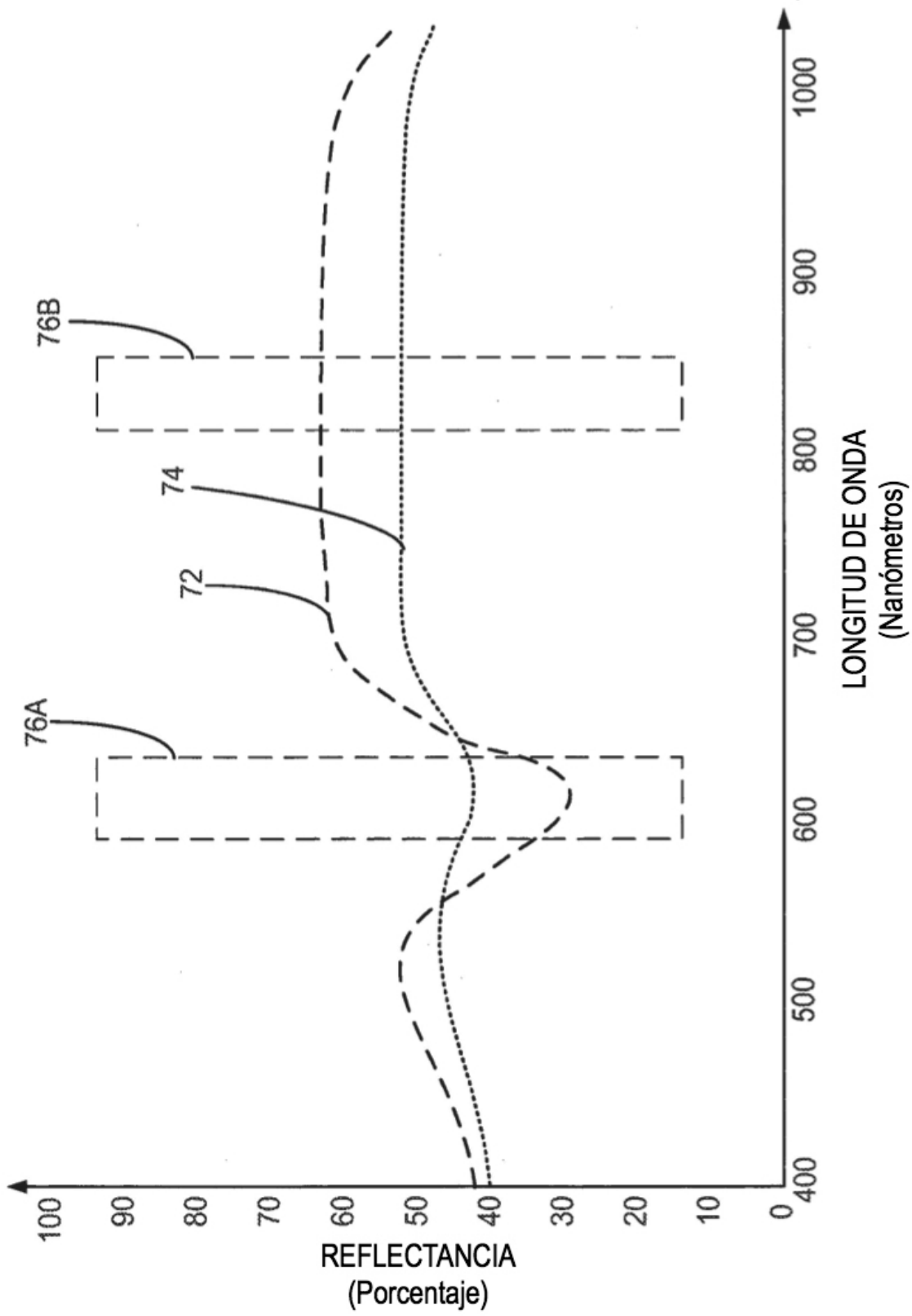


FIG. 7

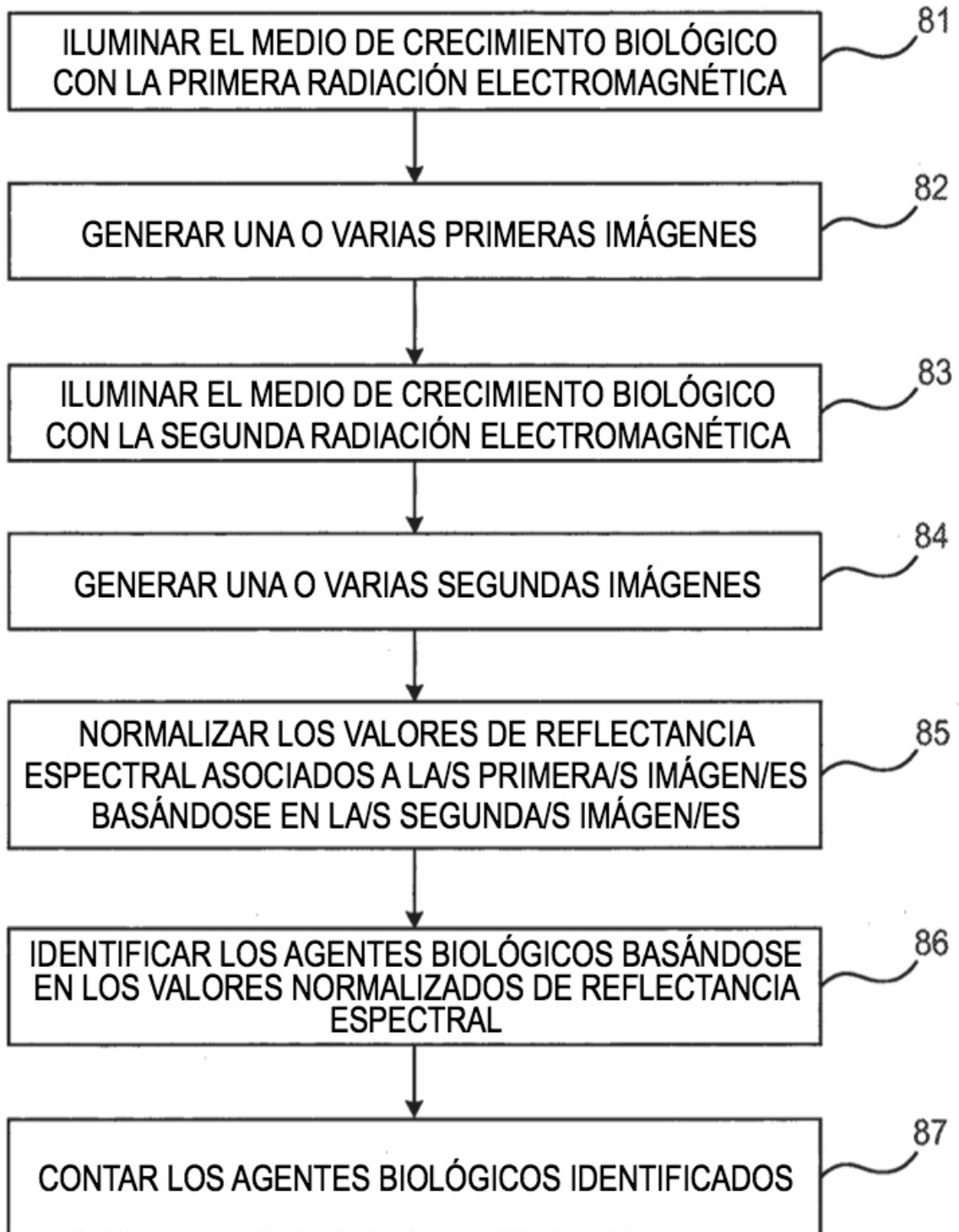


FIG. 8

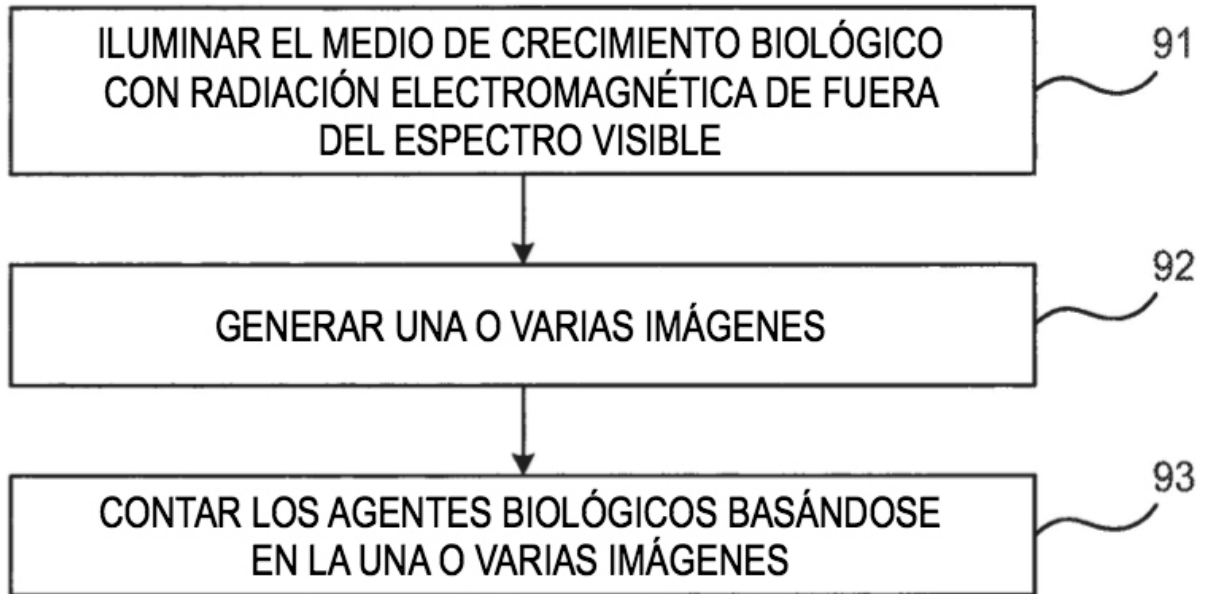


FIG. 9