

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 681**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12M 1/36** (2006.01)

**G01N 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2015 PCT/EP2015/060297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2015 E 15723473 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 3149150**

54 Título: **Método automático para la observación del crecimiento de cultivos celulares**

30 Prioridad:

**07.10.2014 DE 102014220306**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2018**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**DRÖGE, MARC;  
MÜLLER, CHRISTIAN;  
LINNEMANN, ANJA;  
MATHIS, HARALD PETER;  
BORBE, STEFAN;  
HEUP, TORSTEN y  
PIPPOW, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 656 681 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 automático para la observación del crecimiento de cultivos celulares

- 5 La invención se refiere a un método automático para, en particular, la observación en tiempo real del crecimiento de cultivos celulares y, en particular, del crecimiento bacteriano.

Existen varios campos de aplicación en los cuales es interesante poder observar el crecimiento de un cultivo celular de la manera que sea posible en tiempo real. Como ejemplo, se menciona la determinación de la resistencia/eficacia de los antibióticos.

El método convencional para determinar la resistencia a los antibióticos o para determinar la eficacia de los mismos se basa en un enfoque macroscópico. Este proceso lleva un tiempo relativamente largo, ya que las evaluaciones de crecimiento solo se pueden realizar cuando las colonias bacterianas son visibles a simple vista. Esto puede durar entre 6 y 24 horas, lo cual no es tolerable en casos críticos.

En el documento WO-A-2010/129532 se describe un método y un aparato para la detección rápida de bacterias resistentes. Aquí, las células bacterianas inmovilizadas se observan en un medio de cultivo con o sin antibiótico por medio de un microscopio.

Además, en Marlene Fredborg et al., «Real-Time Optical Antimicrobial Susceptibility Testing», Journal of Clinical Microbiology, Band 51, Heft 7, 2013, S. 2047-2053, se describe un aparato de procesamiento de imágenes para pruebas de resistencia a antibióticos.

Bajo el nombre VITEK® 2 existe un método alternativo semiautomático para la prueba de sensibilidad rápida de microorganismos. Aquí, se usa una óptica de transmisión. La cantidad de luz translúcida de una muestra da una indicación del crecimiento del cultivo celular. Cuanto más fuerte es el crecimiento, menos intensa es la luz transmitida. Sin embargo, este método proporciona los primeros resultados de manera fiable solo después de algunas horas como muy pronto.

Los dos métodos antes mencionados no son capaces de determinar el efecto de los antibióticos en células individuales, sino que requieren una variedad de células para ser observadas o la opacidad de una suspensión bacteriana.

El documento DE-T-69409649 describe un método para la determinación de microorganismos presentes en materiales y para la predicción de su crecimiento. En el método, las sustancias/materiales/medios de cultivo pueden seleccionarse para fomentar o inhibir el crecimiento microbiano o la actividad microbicida. Los medicamentos como los antibióticos deben analizarse para detectar actividad contra determinados microorganismos y se debe determinar la concentración necesaria para lograr el efecto.

El documento WO-A-2010/121601 describe un método para el cultivo automatizado en paralelo de células en recipientes de cultivo celular y para la observación continua del crecimiento celular por medio de un microscopio con cámara.

En DE-A-102012223123 se describe un método de enfoque automático para microscopios con una lente, donde figura una muestra que se encuentra en un plano del objeto.

En el documento WO-A-2011/066837 se describe otro método para determinar el crecimiento celular de microorganismos. El crecimiento se estima por métodos estadísticos.

A partir del documento US-A-2009/0185734, se conocen un dispositivo de medición y un método para analizar partículas en una muestra líquida. Estas partículas pueden ser células animales o humanas.

En la publicación BURNHAM, D. [u.a.]: «Rapid Ertapenem Susceptibility Testing and Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Phenotype Detection in Klebsiella pneumoniae Isolates by Use of Automated Microscopy of Immobilized Live Bacterial Cells», J. Clin. Microbiol. (2014/52 (3) 982-986), se describe un método para evaluar la resistencia a Ertapenem por parte de las bacterias usando un sistema de microscopía automatizado.

El documento EP-A-2708890 describe un método para seleccionar una colonia de células monoclonales, en el que se proporciona una pluralidad de espacios de cultivo celular en los que se aplica una suspensión de células a un medio de cultivo.

Por el documento US-A-2007/0069106 se conoce un método para detectar una imagen enfocada.

El documento US-A-2012/0013727 describe el cambio del plano focal de una muestra con respecto a una cámara por medio de un motor paso a paso.

Además, la tesis doctoral de Schumann, E. «Wechselspiel zwischen Doppelstrangbruch-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle am G2/M-Übergang» muestra un procedimiento de examen microscópico para una muestra de células.

- 5 Por último, el documento US-A-2011/0017902 muestra otro método para el posicionamiento del enfoque objetivo en un dispositivo de captación con enfoque automático.

10 El objeto de la invención es proporcionar un método automático para controlar el crecimiento del cultivo celular, en particular, el crecimiento bacteriano, en el que la evaluación del crecimiento es mucho más rápida que en los métodos conocidos posibles.

15 Para resolver este problema, la invención propone un método automático según la reivindicación 1 para la observación del crecimiento del cultivo celular, en particular del crecimiento bacteriano. Las realizaciones individuales del método son el objeto de las respectivas reivindicaciones.

20 En el método de acuerdo con la invención, se usa un software de procesamiento de imágenes, que se usa para la evaluación a intervalos de imágenes grabadas automáticamente del cultivo celular. Se aplica un medio de cultivo con el cultivo celular en un plato receptor particularmente miniaturizado. El medio de cultivo contiene uno o más reactivos, en particular antibióticos. En particular, el cultivo celular se refiere a las bacterias que deben probarse para determinar su resistencia a los antibióticos o la efectividad de un antibiótico.

25 La realización de imágenes automáticas a intervalos se realiza con la ayuda de un microscopio (en particular luz reflejada o transmitida) con una cámara y una unidad óptica receptora y un soporte para la bandeja receptora, que se mueven entre sí a lo largo del eje óptico, en particular en micro pasos. Esto permite seleccionar siempre automáticamente el plano de adquisición de imágenes de forma que se puedan grabar las imágenes del cultivo de células que tengan el mayor contraste posible. Para este fin, el plano de adquisición de imágenes se mueve a través del medio de cultivo moviendo la unidad de grabación óptica y/o el soporte a lo largo del eje óptico, en cada caso se graba una imagen en los diferentes planos de adquisición de imágenes. Como resultado del procesamiento de imagen posterior o simultáneo, en la medida de lo posible, se determina y selecciona la imagen más contrastada.

30 Alternativamente, puede ser suficiente seleccionar del grupo de imágenes tomadas en cada caso una de las que tenga más contraste, siempre que el contraste sea lo suficiente grande para poder realizar el análisis de imágenes mencionado más adelante. Tal procesamiento de imagen es, p. ej. usado en cámaras de enfoque automático y puede usarse de acuerdo con la invención.

35 Para seleccionar la imagen con más contraste o la imagen con suficiente contraste para el posterior procesamiento de la imagen, de acuerdo con la invención, la primera imagen capturada se almacenará como la imagen con más contraste para comparar cada imagen capturada adicional con la imagen almacenada y, si tiene más contraste, se guarda como la imagen anterior determinada con más contraste.

40 Por medio de un módulo de software de procesamiento de imágenes adicional, la imagen respectivamente seleccionada puede examinarse automáticamente con respecto al tamaño del área ocupada por el cultivo de células. Por lo tanto, el crecimiento del cultivo celular se puede observar, por así decirlo, en tiempo real. Un ejemplo de un software adecuado para este fin se describe en Andreas Pippow, Stefan Borbe, Sebastian Röse, Stefan Precht, Thomas Berlage, "Zellteilungsdauer im High-Content-Screening bestimmen", Laborwelt, Nr. 1/2012, pág. 33 y 34, y

45 Thomas Berlage, Andreas Pippow, "Neues Potential für die Pharmaforschung", GIT Labor-Fachzeitschrift, 10/2013, páginas 630 hasta 635,

50 Una característica esencial de la invención es la posibilidad de grabación automática de imágenes con el mejor contraste posible, que requiere la movilidad de la unidad óptica de grabación y/o el usuario del microscopio como en una función de enfoque automático. El nivel de adquisición de imágenes debe rastrearse con el fin de registrar imágenes de alto contraste solo de vez en cuando porque el medio de cultivo podría evaporarse con el tiempo y, por lo tanto, podría cambiar el nivel del medio de cultivo en el receptáculo.

55 El microscopio tiene convenientemente un soporte para la bandeja receptora que puede moverse a lo largo del eje óptico, en particular en pequeños pasos de unas pocas decenas de  $\mu\text{m}$ . También sería posible pensar en mover la unidad óptica del microscopio a lo largo del eje óptico, que es mucho más complicado que el método del usuario. Esto requiere un disco que permita un procedimiento en pasos adecuadamente pequeños.

60 En otra realización conveniente de la invención, se puede prever que, en base a los tamaños de las áreas de las respectivas imágenes seleccionadas ocupadas por el cultivo celular, se determine si el cultivo celular está creciendo y, de ser así, con qué velocidad de crecimiento.

65 Como ya se mencionó anteriormente, se debe suponer que en los momentos respectivos en los que debe grabarse la siguiente imagen con el contraste más alto posible, el plano de grabación de la imagen también ha cambiado desde la respectiva posición anterior. A fin de ahorrar tiempo, puede ser ventajoso, en lugar de la respectiva conducción a través del nivel de grabación de imágenes a través del medio de cultivo, lograr una imagen lo más alta

posible en términos de contraste, si la región dentro de la cual se encuentra el plano de adquisición de imágenes en el medio de cultivo para determinar la imagen del medio de cultivo con mayor contraste o para determinar una imagen del medio de cultivo con un contraste suficiente para determinar el tamaño de la superficie del cultivo celular en el área alrededor de la posición del plano de adquisición de imágenes de la última imagen temporal o una de las imágenes temporalmente anteriores es limitada. En este sentido, se supone que el nivel de adquisición de imagen, en el que se puede grabar la imagen supuestamente más nítida, apenas cambia de un tiempo de grabación al siguiente. Sin embargo, el respectivo desplazamiento completo del nivel de adquisición de imágenes por el medio de cultivo en los tiempos de adquisición de imágenes individuales puede ser necesario debido a que la unidad de enfoque automático se ha ajustado debido a influencias externas, por ejemplo, influencias térmicas o vibraciones, desde el último tiempo de adquisición de imagen.

Como ya se mencionó anteriormente, es conveniente por varias razones usar la bandeja receptora más pequeña posible. Una posibilidad es utilizar una bandeja receptora miniaturizada, que tiene dos láminas con un marco dispuesto entre ellas. Las dos láminas son, por ejemplo, lentes deslizantes. El marco rodea un espacio de recepción, que está cerrado por el propio marco lateralmente y por las dos láminas hacia arriba y hacia abajo. El medio de cultivo (por ejemplo, agar), que se complementa con los cultivos de células a observar y uno o más reactivos, se aplica luego a este espacio de recepción.

Como se puede ver a partir de lo anterior, el objetivo de la presente invención es un método automatizado para el seguimiento en tiempo real del crecimiento bacteriano o crecimiento de cultivos celulares o crecimiento de microorganismos. El método se basa en el uso de un microscopio, que a intervalos de tiempo definidos, con la ayuda de una unidad de enfoque automático, crea imágenes de cultivos celulares sobrecrecidos, en particular superficies de crecimiento miniaturizadas (medio de cultivo). Las imágenes son luego preprocesadas y analizadas por el software de procesamiento de imágenes para finalmente obtener una curva de crecimiento u otro tipo de representación del crecimiento del cultivo celular en función del tamaño del área de las imágenes tomadas y evaluadas en cada punto de tiempo creado.

En el método según la invención para controlar el crecimiento del cultivo celular, en particular el crecimiento bacteriano, se proporciona una placa receptora con un medio de cultivo por encima y/o con un cultivo celular, en particular una muestra bacteriana de tejido humano o animal, como p. ej. sangre, que contiene además uno o más reactivos, concretamente, antibióticos. Se proporciona un microscopio con una cámara y un plano de adquisición de imágenes móviles a lo largo del eje óptico, y el plato receptor para observar un crecimiento potencial del cultivo celular se coloca en el medio de cultivo en el microscopio. En intervalos predeterminables en el rango de minutos de un solo dígito particular, una imagen del medio de cultivo es tomada por la cámara del microscopio. Se mueve el plano de adquisición de imágenes a lo largo del eje óptico a través de la bandeja receptora a través del medio de cultivo, se toma una imagen por plano de adquisición de imagen y mediante software de análisis de imágenes, del grupo de imágenes grabadas, se selecciona automáticamente la imagen con más contraste del medio de cultivo o una imagen del medio de cultivo se selecciona automáticamente y se almacena opcionalmente con suficiente contraste para el siguiente procesamiento automático de imágenes. Mediante el software de análisis de imágenes, el tamaño del área ocupada por el cultivo de células se determina automáticamente en función de la imagen seleccionada. En función de los tamaños de las áreas ocupadas por el cultivo celular de las respectivas imágenes seleccionadas, se determina si el cultivo celular está creciendo o no.

El método de acuerdo con la invención permite la monitorización en tiempo real del crecimiento bacteriano a nivel de colonias bacterianas, así como a nivel celular, lo que significa que, por una parte, se puede derivar rápidamente una curva de crecimiento observando un aumento en el área de crecimiento y, por otro lado, se puede rastrear la división celular de cada individuo individual. Esto proporciona una aceleración sobre las pruebas de resistencia convencionales, proporcionando un método novedoso para, por ejemplo, la investigación con antibióticos, así como el seguimiento automático del crecimiento bacteriano/proliferación bacteriana en períodos cortos y largos.

Los efectos y ventajas de la invención se pueden resumir de la siguiente manera:

- El uso de superficies de crecimiento optimizadas y miniaturizadas permitirá el seguimiento microscópico automatizado del crecimiento a nivel celular. Además, la miniaturización del área de crecimiento ahorra reactivos y material de muestra, lo que brinda una ventaja económica sobre el método convencional.
- El uso de una unidad de enfoque automático del microscopio permite crear fotografías/imágenes automáticamente en intervalos de tiempo específicos. Sin la unidad de enfoque automático, se necesitaría un reenfoque manual antes de cada nueva toma, lo que iría en contra de la automatización.
- Creando curvas de crecimiento del área cubierta por, por ejemplo, bacterias, la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC, por sus siglas en inglés) de antibióticos puede acelerarse significativamente, concretamente en un plazo de 2 a 3 horas en lugar de, como convencionalmente, en un plazo de 5 a 24 horas.

Además de crear una curva de crecimiento basada en la determinación de área basada en la detección en primer plano o de fondo, la invención se basa además en el uso de una función de enfoque automático orientada a la

intensidad de contraste y el uso de áreas de crecimiento en miniatura en particular (por ejemplo, en base de agar u otra base de medio de cultivo).

Los casos de uso para el método de la invención son

- Observación de divisiones celulares (bacterianas),
- Determinación de resistencia a antibióticos,
- Observación de la influencia de diversas sustancias sobre el crecimiento bacteriano o las divisiones celulares y
- Observación de la influencia de la administración combinatoria de antibióticos sobre el crecimiento bacteriano o las divisiones celulares.

Software de procesamiento de imágenes para determinar automáticamente el tamaño de las áreas seleccionadas de una imagen, como en el caso presente, el área ocupada por el cultivo de células es básicamente conocida. Un ejemplo es el software desarrollado por el solicitante con el nombre ZETA (véanse también las dos referencias no relacionadas con patentes citadas anteriormente).

La invención se explicará con más detalle con referencia al dibujo. En detalle, muestran:

la figura 1, un esquema de un microscopio de luz incidente que se puede usar de acuerdo con la invención,

la figura 2, una ampliación del conjunto deslizante con bandeja receptora miniaturizada,

la figura 3, un esquema del principio funcional para la determinación automática de la imagen de mayor contraste,

la figura 4, ejemplos de grabaciones del cultivo celular en crecimiento en diferentes momentos A, B y C y las imágenes recalculadas correspondientes a estas grabaciones para el reconocimiento de primer plano o de fondo para la determinación automática del área de cultivo celular, y

la figura 5, tres ejemplos de curvas de crecimiento creadas de acuerdo con la invención.

En la figura 1, se muestra un microscopio de luz reflejada 10 mostrado en este ejemplo de realización, que tiene un cuerpo de microscopio 12 con unidad de iluminación de luz reflejada 13 y, en particular, un elemento móvil en pequeños incrementos a lo largo del eje óptico del soporte de microscopio 14 (mesa-Z móvil). El cuerpo del microscopio 12 comprende además una unidad óptica receptora 16 y una cámara 18. El eje óptico está indicado en 20.

Como alternativa al microscopio de luz reflejada, se puede usar un microscopio de luz transmitida según la invención. El posicionamiento de la unidad de iluminación de luz transmitida que se utilizará en este caso se muestra en 22 en líneas discontinuas.

En el soporte 14 hay una bandeja de recepción 24, que se muestra en la figura 2 a mayor escala. La bandeja de recepción 24 tiene una deslizadora inferior 26 y un vidrio de cubierta 28, como en concreto dos láminas o discos 30, 31, entre los cuales en particular se dispone un marco 34 preparado como una cinta adhesiva de doble cara 32. Este marco 34 define en su interior el espacio de recepción 36 para un medio de cultivo 38 (que es, por ejemplo, agar) sobre el que crecen las bacterias 40. El medio de cultivo se proporciona con un reactivo como, por ejemplo, un antibiótico. Las bacterias 40 pueden ser parte de, por ejemplo, una muestra de sangre a analizar.

En la figura 3, se muestra el principio de funcionamiento de la determinación automática de la imagen de mayor contraste, que se registra en un momento determinado después del comienzo del crecimiento bacteriano. El plano de grabación de imágenes se mueve a través de la bandeja de recepción 24 por medio del soporte 14, que se puede mover en incrementos mínimos. Se toma una foto por paso. Se indaga la intensidad de contraste en diferentes posiciones Z. En la figura 3 esto se muestra por el ejemplo en la grabación de un cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus*. El diagrama de la figura 3 muestra la intensidad de contraste (en A.U.) en función de la posición Z (en  $\mu\text{m}$ ). A modo de ejemplo, se muestran tres imágenes con las intensidades de contraste asignadas.

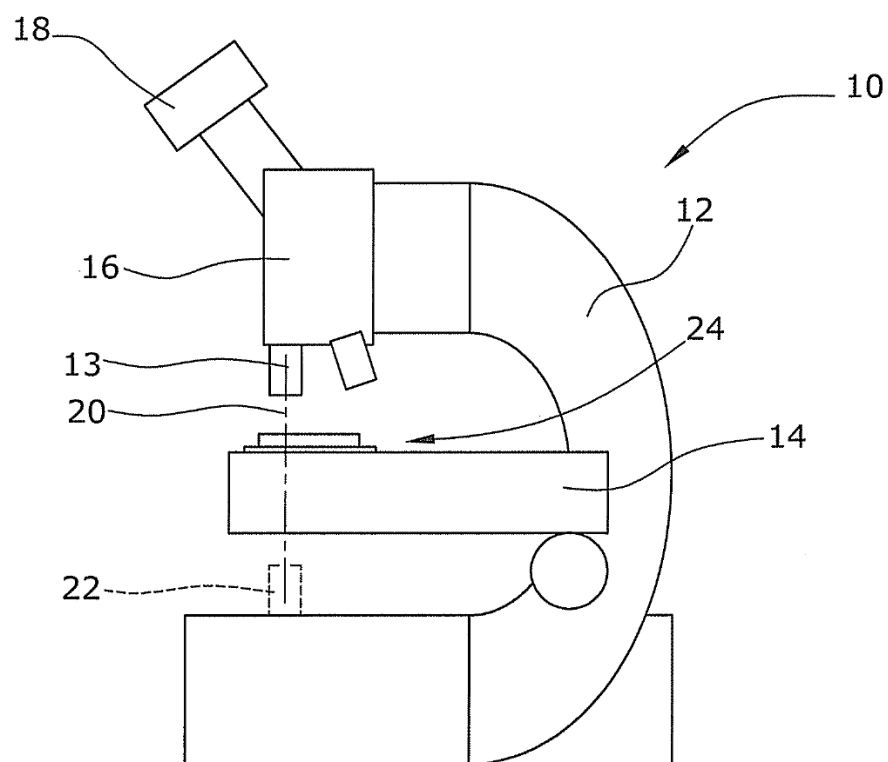
La figura 4 muestra ejemplos del reconocimiento de primer plano o de fondo por el software ZETA ya mencionado del solicitante utilizando el ejemplo de un análisis de crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*). La fila superior (A-C) muestra las imágenes originales, donde A representa el comienzo de una serie temporal, B se registra después de aproximadamente una hora y C después de 6 horas. La segunda fila inferior (A'-C ') muestra las detecciones de primer plano o de fondo correspondientes como representaciones en blanco y negro.

Por último, la figura 5 muestra tres ejemplos de curvas de crecimiento bacteriano de la invención para un ensayo de resistencia a antibióticos de *E. coli* para medio LB (véase la curva 42), para ampicilina (véase la curva 44) y para

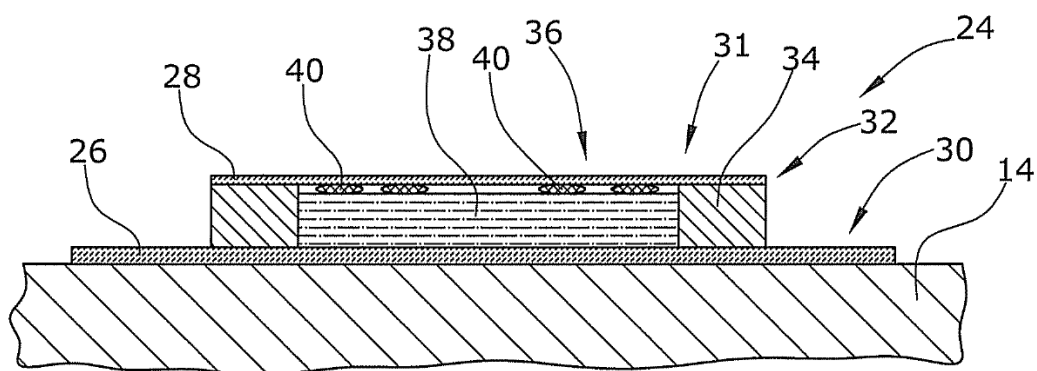
kanamicina (véase la curva 46).

## REIVINDICACIONES

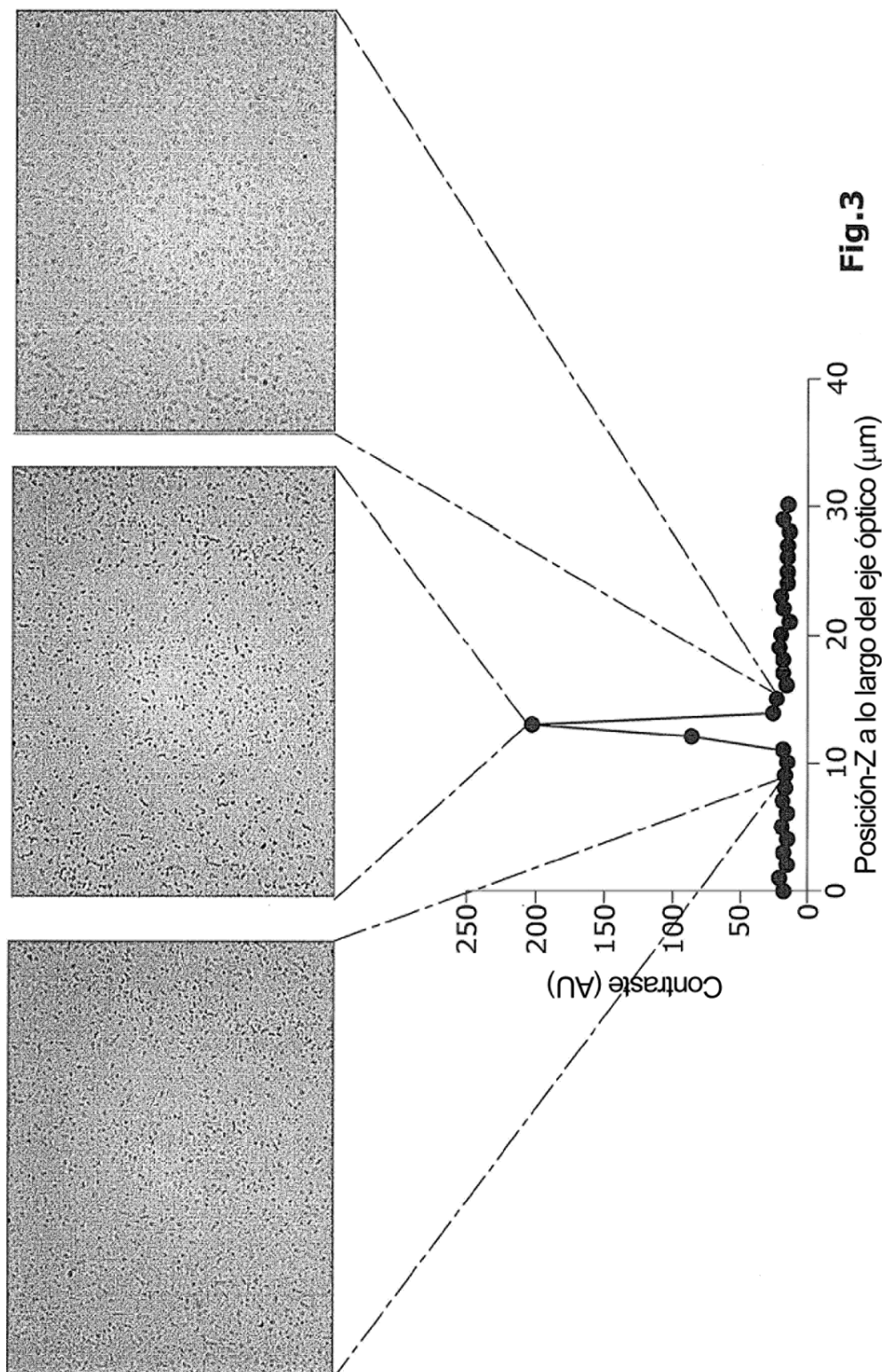
1. Un método automático para controlar el crecimiento del cultivo celular, en particular el crecimiento bacteriano, en el que mediante el método:
  - 5 - se proporciona una placa receptora (24) con un medio de cultivo (38) sobre el que se cultiva una célula, en particular una muestra bacteriana de tejido humano o animal, tal como p. ej. sangre, que contiene, adicionalmente, uno o más reactivos, en particular antibióticos,
  - 10 - se proporciona un microscopio (10) que tiene un eje óptico (20) con cámara (18) y un soporte (14) para la bandeja receptora (24) que se puede mover automáticamente a lo largo del eje óptico (20) y/o una unidad óptica de grabación movable automáticamente (16) que se puede mover a lo largo del eje óptico (20),
  - 15 - la bandeja de recepción (24) para observar un posible crecimiento del cultivo celular en el medio de cultivo (38) se coloca en el microscopio (10),
  - 20 - en intervalos predeterminables en el rango de minutos de un solo dígito particular, una imagen del medio de cultivo (38) es tomada por la cámara (18) del microscopio (10) por medio del soporte móvil (14) y/o la unidad óptica de fotografía (16) del microscopio (10) se desplaza en el plano de adquisición de imagen a lo largo del eje óptico (20) a través del medio de cultivo (38), se toma una imagen por plano de adquisición de imagen y mediante software de análisis de imágenes, del grupo de imágenes grabadas, la imagen con más contraste del medio de cultivo (38) o una imagen del medio de cultivo (38) con suficiente contraste para el posterior procesamiento automático de imágenes se selecciona automáticamente y opcionalmente se almacena,
  - 25 - donde, para seleccionar la imagen con más contraste o para seleccionar la imagen con suficiente contraste para el posterior procesamiento de imágenes, la primera imagen capturada se almacenará como la imagen con más contraste para comparar cada imagen capturada adicional con la imagen almacenada y, si tiene más contraste, se guarda como la imagen anterior determinada con más contraste,
  - 30 - el uso del software de análisis de imágenes basado en la imagen seleccionada determina automáticamente el tamaño del área ocupada por el área de cultivo celular y
  - 35 - se determina si el cultivo celular está creciendo o no en función del tamaño de las áreas ocupadas de cultivo celular de las imágenes seleccionadas.
2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque se determina sobre la base de los tamaños de las áreas ocupadas de cultivo celular de las respectivas imágenes seleccionadas, si el cultivo celular está creciendo y, de ser así, con qué velocidad de crecimiento.
- 40 3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por el paso de atravesar el plano de adquisición de imágenes a través del plato receptor (24) y el medio de cultivo (38) moviendo elementos ópticos de la unidad óptica receptora (16) del microscopio (10) a lo largo del eje óptico (20) y/o por movimiento de la bandeja de recepción (24) que tiene un soporte (14) a lo largo del eje óptico (20) del microscopio (10).
- 45 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el área dentro del plano de adquisición de imágenes en el medio de cultivo (38) para determinar la imagen del medio de cultivo (38) con mayor contraste o para determinar una imagen del medio de cultivo (38) con un contraste suficiente para determinar el tamaño de la superficie del cultivo celular, se limita al área alrededor de la posición del plano de adquisición de imágenes de la última imagen temporal o una de las imágenes temporalmente anteriores.
- 50 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la bandeja de recepción (24) presenta dos láminas, en particular una corredera (26) y una tapa de vidrio (28), con un marco (34) dispuesto entre ellas, en la que el marco (34) rodea al espacio de recepción (36) de la bandeja de recepción (24).
- 55 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque a partir de los tamaños de las áreas ocupadas de cultivo celular de las respectivas imágenes seleccionadas, se crea una curva de crecimiento.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como microscopio (10) se selecciona un microscopio de luz reflejada o un microscopio de luz transmitida.



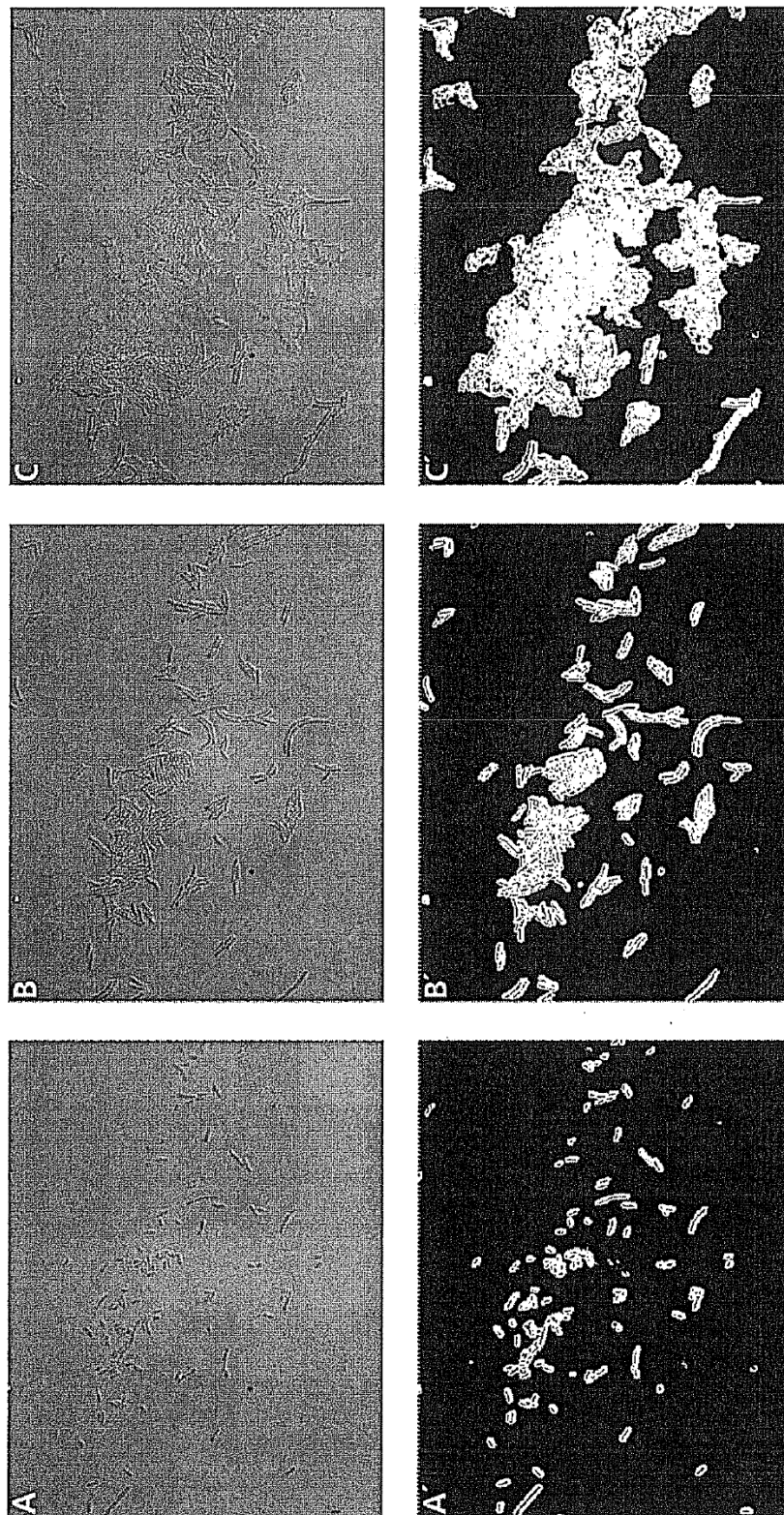
**Fig.1**



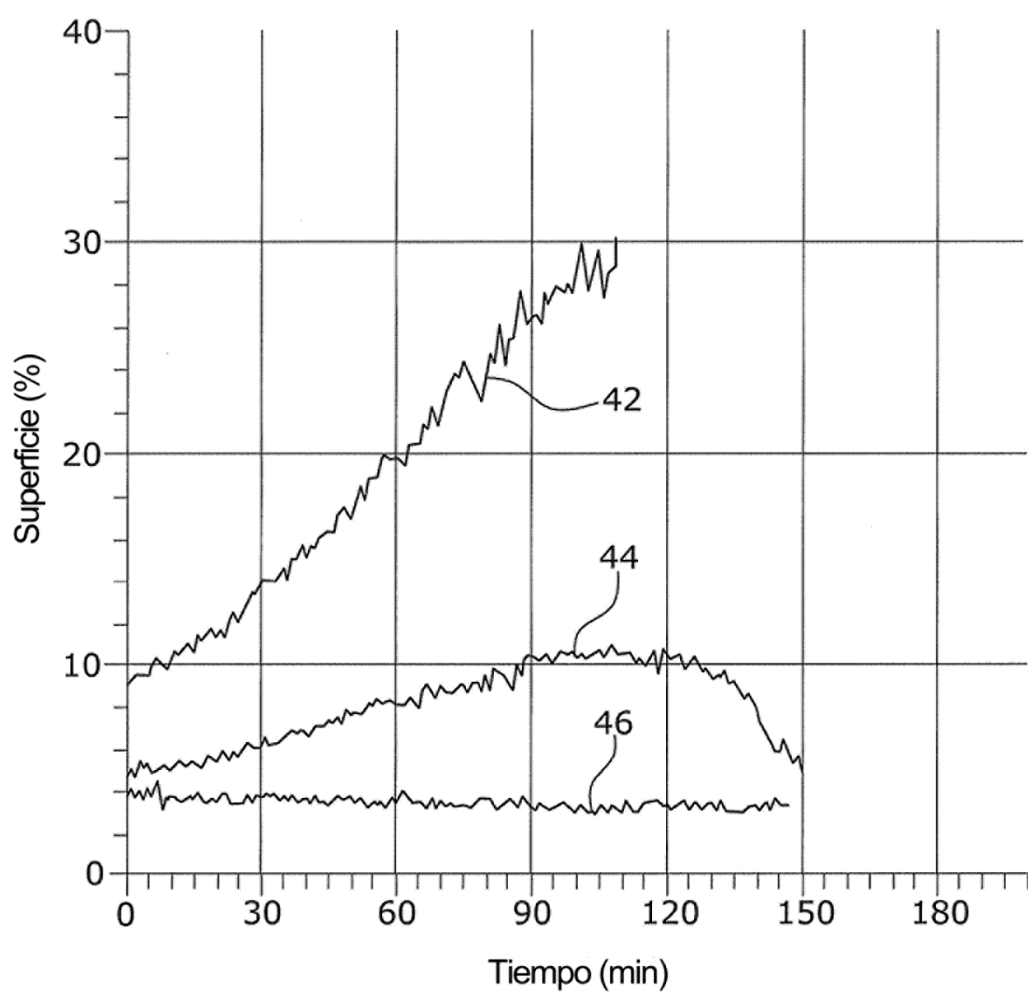
**Fig.2**



**Fig.3**



**Fig.4**



**Fig.5**