(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 716 170**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2016** **E 16174717 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 3257947**

(54) Título: **Método y sistema de identificación del tipo de Gram de una bacteria**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2019

(73) Titular/es:

BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy L'etoile, FR

(72) Inventor/es:

LEROUX, DENIS;
LALOUM, ERIC;
MAHE, PIERRE;
MIDAHUEN, RONY y
BARLAS, PHILIPPINE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 716 170 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 y sistema de identificación del tipo de Gram de una bacteria

Campo de la invención

La invención se refiere al campo del análisis microbiológico, y en particular a la identificación del tipo de Gram de una bacteria.

De manera ventajosa, la invención se aplica al análisis de una imagen hiperespectral o multiespectral de una colonia bacteriana que se ha desarrollado en un medio nutritivo no cromogénico, no fluorogénico y desprovisto de colorante.

Estado de la técnica

La clasificación de Gram de una cepa de bacterias permite caracterizar la pared de la misma, por ejemplo, su porcentaje de peptidoglicano, y se usa en la taxonomía de las bacterias Gram « positivas » y las bacterias Gram « negativas ». El conocimiento del tipo de Gram de una cepa bacteriana permite, por ejemplo, seleccionar ensayos apropiados para la identificación de la cepa o la preparación de un antibiograma, por ejemplo, la elección de una tarjeta adecuada para un ensayo de antibiograma realizado por el dispositivo automático Vitek© 2 comercializado por la Solicitante.

Históricamente, el tipo de Gram de una cepa bacteriana se determinaba mediante una técnica manual conocida como « tinción de Gram », que comprende un gran número de etapas manuales (fijación, tinción, tratamiento con mordiente, lavado, sobretinción...), y por lo tanto de realización larga. Por lo tanto, se han desarrollado diversas técnicas para automatizar la detección del tipo de Gram de las bacterias, en particular con el fin de tratar un gran número de muestras de ensayo. Sin embargo, estas técnicas esencialmente continúan modificando la respuesta electromagnética de las bacterias o de su medio para hacer que sus Gram sean fácilmente observables.

Por ejemplo, un primer tipo de técnica consiste en automatizar la tinción de la membrana bacteriana en portaobjetos de microscopio, pero la etapa de decisión final sobre el tipo de Gram siempre es realizada por un técnico que observa los portaobjetos bajo un microscopio. Por lo tanto este tipo de técnica no está completamente automatizada, y también es difícil de automatizar. En efecto, la diferencia de colores entre las bacterias de Gram positivo y las bacterias de Gram negativo puede ser sutil, lo que explica por qué aún se necesita la intervención de un técnico de laboratorio.

Un segundo tipo de técnica consiste en colocar bacterias en presencia de un sustrato que se degrada mediante una reacción enzimática iniciada por los peptidoglicanos de las membranas de las bacterias. Esta reacción produce cromóforos o fluoróforos cuya concentración es una indicación del Gram. Normalmente se habla de « marcado » cromogénico o fluorogénico de las bacterias. Si este tipo de técnicas del estado de la técnica se pueden automatizar, por ejemplo, midiendo la intensidad luminosa de los cromóforos/fluoróforos con la ayuda de un dispositivo apropiado (por ejemplo, espectrómetro/fluorómetro) y a continuación comparando por vía informática la intensidad medida a valores de umbral definidos previamente, sin embargo, suponen el diseño de sustratos cromogénicos o fluorogénicos particulares, que a menudo son de coste elevado.

Además, sea cual sea que sea la técnica usada, las bacterias experimentan una modificación de su estado natural (p. ej., comprenden tintes, han fijado marcadores cromogénicos o fluorescentes, etc.) y, por lo tanto, ya no se pueden usar para ensayos de caracterización posteriores (por ejemplo, la determinación de un antibioGrama).

El documento « Hyperspectral microscope imaging methods to classify gram positive and gram-negative foodborn pathogenic bacteria » de Bosoon Park *et al* (Bosoon P *et al.,* Transactions of the ASABE 2015; 58 (1): 5-16) describe un método de detección del tipo de Gram de una bacteria en el intervalo de de longitud de onda de 450 nm-800 nm. El documento WO2010/077304 escribe la detección del tipo de Gram de una bacteria mediante el análisis de su fluorescencia intrínseca. El documento « Spectroscopic characterization of biological agents using FTIR, normal Raman and surface-enhanced Raman scattering » de Luna-Pineda T. *et al* (Luna-Pineda T *et al.,* Proc of SPIE 2007; 6554: 65540K1-11) describe la detección del tipo de Gram de una bacteria que se basa en la medición de SERS (« Surface Enhanced Raman Scattering »). El documento « Hyperspectral imaging for presumptive identification of bacterial colonies on solide chromogenic culture média » de Guillemot M. *et al* (Guillemot M *et al.,* Proc of SPIE 2016; 9887: 98873L1-12) describe una posibilidad de detección del tipo de Gram de una bacteria mediante el análisis de una imagen hiperespectral de una colonia p de dicha bacteria.

Exposición de la invención

El objeto de la presente invención es proponer un método de determinación del tipo de Gram de una cepa de bacterias que será automático y que no necesite marcar o colorear la bacteria para determinar su Gram.

En este sentido, la invención tiene como objeto un método de detección del tipo de Gram de una cepa bacteriana, que comprende:

- la iluminación en el intervalo de longitudes de onda de 415 nm-440 nm de al menos una bacteria de dicha cepa que tiene una respuesta electromagnética natural en dicho intervalo;
- la adquisición, en el intervalo de 415 nm-440 nm, de una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y
- la determinación del tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en el intervalo de 415 nm-440 nm.

Por respuesta « electromagnética natural », en el sentido de la invención se hace referencia a que la bacteria no se modifica con la ayuda de elementos (colorante, cromógeno, fluorógeno, etc.) que modifican su respuesta electromagnética a una iluminación al menos en el intervalo de longitudes de onda de de interés. Por ejemplo, una colonia de la cepa se cultiva en un medio nutritivo no coloreado, no cromógeno y no fluorescente y la iluminación/adquisición se realiza directamente sobre la colonia incluso presente en su medio.

En otras palabras, los inventores han descubierto un intervalo de longitudes de onda en el que una bacteria tiene « naturalmente » una firma electromagnética característica de su tipo de Gram. Por lo tanto el método de acuerdo con la invención consiste en medir esta firma y a continuación extraer el tipo de Gram. Por lo tanto, no es necesario usar un sustrato cromógeno o fluorógeno o colorantes. Además, el método de acuerdo con la invención es rápido en la medida en la que consiste en iluminar, medir un espectro y realizar un tratamiento, en particular informático, de este espectro.

De acuerdo con un modo de realización, dicha bacteria también tiene una respuesta electromagnética natural en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm, y:

- la iluminación de dicha bacteria también se realiza en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm;
- la adquisición de una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, la bacteria iluminada también se realiza en el intervalo de 750-800 nm; y
- la determinación del tipo de Gram la cepa bacteriana se realiza en función de las intensidades luminosas adquiridas en dichos intervalos de 415 nm-440 nm y de 750 nm-800 nm.

En otras palabras, la bacteria también comprende una firma electromagnética natural en el intervalo de 750 nm-800 nm característica de su Gram. La detección de su Gram también se puede realizar en este intervalo. De forma ventajosa, combinando los dos intervalos de longitudes de onda, se obtiene una mejor precisión en la determinación del tipo de Gram.

De acuerdo con un modo de realización, la determinación del tipo de Gram comprende:

- el cálculo de un factor de reflectancia o de absorción de dicha bacteria iluminada en función de la intensidad luminosa adquirida;
- la determinación del tipo de Gram en función del factor de reflectancia o de absorción calculado.

En otras palabras, el factor de reflectancia o de absorción reflejan de manera más fiel el comportamiento electromagnético natural de la bacteria, ya que esto corrige la señal medida del comportamiento espectral de la iluminación y del sensor (por ejemplo, el punto blanco, el punto negro, la no uniformidad del espectro de la iluminación en el intervalo o intervalos de interés, etc.) y por lo tanto permiten la detección más precisa.

En particular, la determinación del tipo de Gram comprende:

- el cálculo de una derivada primera en la longitud de onda del factor de reflectancia o de absorción calculado;
- la determinación del tipo de Gram en función de la derivada primera calculada.

En otras palabras, los inventores han observado que la firma electromagnética característica del Gram es más discriminante derivando la intensidad luminosa o el factor de reflectancia/absorción, lo que permite la detección más precisa.

De acuerdo con un modo de realización, la determinación del tipo de Gram se realiza en función de la intensidad luminosa a una longitud de onda única del intervalo de 415 nm-440 nm, en particular la longitud de onda de 420 nm. Más particularmente, la determinación del tipo de Gram comprende:

- la comparación de un valor igual a la intensidad luminosa a 420 nm, o calculado a partir del mismo, con un primer y segundo umbrales determinados previamente que separan la tinción de Gram positivo de la tinción de Gram negativo, el primer umbral siendo superior al segundo umbral;
- la determinación del Gram negativo si dicho valor es superior al primer umbral y la determinación del Gram positivo si dicho valor es inferior al segundo umbral.

En otras palabras, se obtiene un buen tipo de precisión en la detección con una sola longitud de onda, en particular a 420 nm. En particular, una simple determinación del umbral permite tener una precisión mínima de un 80 %. Esto permite simplificar los cálculos informáticos y/o la iluminación y el sensor. La determinación se puede realizar a partir de la propia intensidad luminosa o después de un tratamiento previo de la misma (por ejemplo, filtrado del ruido, retirada de un offset, paso a una derivada primera o segunda, etc.).

De acuerdo con un modo de realización, la determinación del tipo de Gram comprende la aplicación de una predicción lineal determinada previamente que relaciona la intensidad luminosa adquirida, o un valor calculado a partir de la misma, con el tipo de Gram, seguido por una determinación del umbral del resultado de la predicción lineal aplicada. Una técnica de ese tipo permite conseguir tipos de precisión superior a [*a completar*].

Por el contrario, la determinación del tipo de Gram comprende la aplicación de una clasificación de dos clases de tipo SVM a la intensidad luminosa adquirida, o a un valor calculado a partir de la misma.

De acuerdo con un modo de realización la iluminación y la adquisición se realizan directamente sobre una muestra de ensayo que comprende una colonia de la cepa bacteriana y un medio nutritivo en el que dicha colonia ha crecido.

En otras palabras, la invención se aplica de forma ventajosa directamente sobre una muestra de ensayo normalmente producida en el flujo de trabajo microbiano, es decir, el crecimiento de la colonia, por ejemplo sobre placas de Petri, de modo que la invención no implica la previsión de la preparación de la muestra de ensayo específica para su realización. Además, una colonia comprende una cantidad muy elevada de bacterias de la cepa. Por lo tanto, medir la intensidad reflejada por, o transmitida a través, de una colonia permite aumentar de forma natural el grado de fiabilidad de la detección, la intensidad siendo naturalmente un promedio por ejemplo. Sin embargo se observará que la invención se aplica a la detección individual de bacterias, un estudio estadístico pudiendo realizarse cuando se observan varias bacterias. Además, la invención se aplica evidentemente a medios diferentes a los usados habitualmente en las placas de Petri (normalmente gelosas), como por ejemplo medios líquidos que tienen las bacterias en suspensión.

En particular, la determinación del tipo de Gram se realiza en función de dicho medio nutritivo. En otras palabras, el medio nutritivo también tiene su propia « firma electromagnética » en los intervalos de longitudes de onda de interés, y por lo tanto puede alterar la detección del tipo de Gram. Teniendo en cuenta el medio nutritivo, ya sea durante el tratamiento, ya sea durante la elección del usado para el crecimiento de la colonia, se obtiene una precisión de detección mejor.

En particular, un sustrato opaco en cuya superficie ha crecido la colonia, dicho sustrato teniendo de preferencia una reflectancia ρ inferior o igual a un 10 %, de preferencia inferior o igual a un 5 %. En particular en el contexto de una detección basada en la intensidad luminosa reflejada, se obtiene una precisión mejor.

De acuerdo con un modo de realización, la adquisición de la intensidad luminosa comprende la adquisición de una imagen hiperespectral o multiespectral de una colonia de bacterias de la cepa, y la intensidad luminosa se determina en función de al menos un píxel de dicha imagen que corresponde a la colonia. En particular, la intensidad luminosa es igual a la media de píxeles de dicha imagen que corresponde a la colonia.

En otras palabras, la formación de imágenes hiperespectrales u multiespectrales permite adquirir de manera simultánea los dos intervalos de 415 nm-440 nm y de 750 nm-800 nm con la ayuda de un solo sensor, y además permite obtener una media espacial de cada longitud de onda adquirida sobre varios píxeles, lo que aumenta la precisión de la detección. Como ya se sabe por sí mismo, extermino « hiperespectral » corresponde a la adquisición de un intervalo de longitudes de onda en su conjunto (casi sin toma de muestras) mientras que el término « multi espectral » devuelve generalmente a la adquisición e intervalos distintos.

La invención también que con objeto sistema para la realización del método que se acaba de describir. En particular, la invención tiene como objeto sistema de detección del tipo de Gram de una cepa bacteriana, que comprende:

- una iluminación configurada para iluminar, en el intervalo de longitudes de onda de 415 nm-440 nm, al menos una bacteria de la cepa;
- un sensor configurado para adquirir, en el intervalo de 415 nm-440 nm, una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y
- una unidad informática configurada para determinar el tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en el intervalo de 415 nm-440 nm.

De acuerdo con un modo de realización:

- la iluminación se configura para iluminar dicha bacteria en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm;
- el sensor se configura para adquirir, en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm, una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y

- la unidad informática se configura para determinar el tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en dichos intervalos de 415 nm-440 nm y de 750 nm-800 nm.

De acuerdo con un modo de realización, el sistema se configura para iluminar, y adquirir la imagen de, una muestra de ensayo que comprende una colonia de bacterias de dicha cepa y medio nutritivo en el que dicha colonia ha crecido, en particular una placa de Petri.

Breve descripción de las figuras

La invención se comprenderá mejor con la lectura de la descripción que sigue a continuación, proporcionada únicamente a modo de ejemplo, y hacer relación con las figuras adjuntas, en las que referencias idénticas designan elementos idénticos o análogos, y en las que

- la figura 1 es una vista esquemática de un sistema de predicción del tipo de Gram de acuerdo con la invención;
- la figura 2 es un organigrama de un método de predicción del tipo de Gram realizado con la ayuda del sistema de la figura 1;
- las figuras 3A y 3B son gráficos que ilustran espectros de reflectancia de colonias bacterianas que han crecido sobre un medio transparente;
- las figuras 4A y 4B son gráficos que ilustran espectros de reflectancia de colonias bacterianas que han crecido sobre un medio opaco;
- la figura 5 es un gráfico que ilustra el modelo de predicción lineal usado para la predicción de acuerdo con una variante de la invención;
- la figura 6 es un gráfico que ilustra la correlación obtenida con un modelo lineal mono-canal de predicción para las diferentes longitudes de onda de adquisición;
- la figura 7 es un gráfico que ilustra de los resultados de predicción del tipo de Gram por medio del modelo lineal mono-canal de predicción;
- la figura 8 ilustra una tabla de diferentes variables de decisiones que se pueden usar para la predicción de acuerdo con la invención;
- la figura 9 es un gráfico que ilustra de los resultados de predicción del tipo de Gram por medio de un modelo lineal multi-canal de predicción;
- la figura 10 es un gráfico que ilustra los parámetros del modelo multi-canal en función de las longitudes de onda de adquisición;
- la figura 11 es un gráfico que ilustra los componentes del modelo de predicción basado sobre una clasificación SVM en función de las longitudes de onda de adquisición;
- la figura 12 es un gráfico que ilustra los componentes del modelo de predicción basado sobre un aprendizaje de tipo « fused Lasso » en función de las longitudes de onda de adquisición; y
- las figuras 13A y 13B son gráficos que ilustran espectros de reflectancia de colonias bacterianas que han crecido sobre un medio TSA y MH2.

Descripción detallada de la invención

En lo sucesivo, la notación $A_{i,j}$ se refiere al elemento de la $i^{ésima}$ línea y de la $j^{ésima}$ columna de la matriz A.

Haciendo referencia a la figura 1, un sistema 10 de detección del tipo de Gram de una cepa bacteriana de acuerdo con un primer modo de realización comprende:

- un dispositivo 12 de adquisición de imagen hiperespectral; y
- una unidad 14 informática de tratamiento de datos conectada (por ejemplo, mediante una unión con cables o sin cables), al dispositivo 12 para su control y para la recepción y el tratamiento de las imágenes adquiridas con el dispositivo 12.

El dispositivo 12, por ejemplo un sistema de formación de imágenes hiperespectrales de referencia « Pika II » de la compañía Resonon, Montana USA, comprende:

- una cámara denominada « hiperespectral » 18, constituida por un sensor digital que comprende una red de sensores elementales, por ejemplo, un sensor digital de tipo CCD o CMOS, sensible en el intervalo de longitudes de onda de $[\lambda_{mín}; \lambda_{máx}]$ = [400; 900] nanómetros, y de un elemento de dispersión de la luz o de un espectrógrafo para seleccionar una longitud de onda a adquirir con el sensor;
- un objetivo 20 para focalizar sobre el sensor digital de la cámara 18, la imagen óptica de una placa de Petri 22, con el que se busca adquirir una imagen hiperespectral;
- una iluminación anterior 24, constituida por ejemplo por una o varias lámparas halógenas, por ejemplo, 2 o 4 lámparas, adecuada para emitir luz en el intervalo de $[\lambda_{mín}; \lambda_{máx}]$ y para realizar una iluminación anterior uniforme de la placa de Petri 22. Por ejemplo, las iluminaciones son lámparas de luz blanca;
- una iluminación posterior 26, constituida por ejemplo por una matriz de LED de luz blanca, para realizar una iluminación posterior uniforme de la placa de Petri 22 en el intervalo de $[\lambda_{mín}; \lambda_{máx}]$; y

- un carro 28 sobre el que reposa placa de Petri 22 y que permite a esta última de desplazarse delante del objetivo 20 con el fin de obtener una imagen entera de la placa 22 mediante barrido.

El dispositivo 12 se configura por ejemplo para adquirir la imagen de una región de 90 milímetros por 90 milímetros con un paso de toma de muestra de 160 micrómetros (resolución espacial calculada a 300 micrómetros) y con una resolución espectral de 1,7 manómetros en el intervalo [$\lambda_{mín}$; $\lambda_{máx}$].

El dispositivo 12 produce de ese modo una imagen digital *HSI* de la luz reflejada por la placa de Petri, que tiene N líneas y M columnas, la placa de Petri 22 estando preferentemente abierta (es decir, sin su tapa):

$$HSI(\lambda) = \begin{pmatrix} Rad_{1,1}(\lambda) & \dots & Rad_{1,j}(\lambda) & \dots & Rad_{1,M}(\lambda) \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ Rad_{i,1}(\lambda) & \dots & Rad_{i,j}(\lambda) & \dots & Rad_{i,M}(\lambda) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ Rad_{N,1}(\lambda) & \dots & Rad_{N,j}(\lambda) & \dots & Rad_{N,M}(\lambda) \end{pmatrix} \quad (1)$$

El brillo de un píxel, comúnmente denominado « intensidad luminosa », corresponde en el presente documento a la cantidad de luz incidente sobre la superficie del sitio sensible elemental que corresponde al sensor de la cámara 18 durante el periodo de duración de la exposición, como esto se conoce por sí mismo en el campo de la fotografía digital por ejemplo.

Cada píxel $Rad_{i,j}(\lambda)$ se compone de un espectro digital del brillo de la placa 22 que corresponde al píxel a diferentes longitudes de onda [$\lambda_{mín}$; $\lambda_{máx}$], el espectro digital expresándose de acuerdo con la relación:

$$\forall (i,j) \epsilon [1,N] \times [1,M] : Rad_{i,j}(\lambda) = \begin{pmatrix} Rad_{i,j}(\lambda_{mín}) \\ Rad_{i,j}(\lambda_{mín} + \Delta\lambda) \\ Rad_{i,j}(\lambda_{mín} + 2 \times \Delta\lambda) \\ \vdots \\ Rad_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) \\ \vdots \\ Rad_{i,j}(\lambda_{máx}) \end{pmatrix} \quad (2)$$

en la que $\Delta\lambda$ es la resolución espectral y p es un número entero positivo que pertenece a $\left[0, P = \frac{\lambda_{máx} - \lambda_{mín}}{\Delta\lambda}\right]$. Las longitudes de onda de adquisición $\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda$ se denominan habitualmente con los términos de « canales ».

La unidad 14 de tratamiento de datos es por ejemplo un ordenador personal, una tablet, un smartphone, un servidor, una supercalculadora, o más generalmente con el sistema a base de microprocesador(es), en particular de tipo DSP (« digital signal processor »), a base de circuitos de tipo FPGA, a base de circuitos que mezclan estos tipos de tecnología, etc., configurado para realizar un tratamiento de las imágenes *HSI* producidas por el dispositivo de adquisición 12. La unidad 14 está provista en particular del conjunto de las memorias (RAM, ROM, caché, memoria de masa,...) para la memorización de las imágenes producidas por el dispositivo 12, de instrucciones informáticas para la realización del método de acuerdo con la invención, de parámetros útiles para esta realización y para la memorización de los resultados de los cálculos intermedios y finales, en particular el tipo de Gram determinado. La unidad 14 comprende opcionalmente una pantalla de visualización para visualizar el resultado final de la determinación del tipo de Gram. Aunque se describe una sola unidad de tratamiento, la invención se aplica evidentemente a un tratamiento realizado con varias unidades de tratamiento (por ejemplo, una unidad unida en la cámara 18 para realizar un tratamiento previo de las imágenes *HSI* y una unidad externa al dispositivo 12 para la realización del resto del tratamiento). Además con el sistema se puede completar con una interfaz que permite entrar en la unidad 14 de los datos relativos a la muestra de ensayo, en particular el tipo de medios de cultivo usado cuando la predicción depende del medio, por ejemplo, por medio de un teclado/ratón y de un menú ejecutado a disposición del operario, un lector de código de barras/código QR que lee un código de barras/código QR presente en la placa de Petri y que comprende informaciones sobre el medio, etc.

Un método 30 de determinación del tipo de Gram de una cepa bacteriana por medio de un sistema que se acaba de describir se detalla en la actualidad en relación con el organigrama de la figura 2.

En una primera etapa 32 del método, al menos una colonia de la cepa bacteriana se cultiva en la superficie de un medio nutritivo, o « de cultivo », depositado en una placa de Petri. El medio nutritivo, tiene como objeto principal hacer crecer dicha colonia, y opcionalmente reforzar la precisión de la detección del tipo de Gram limitando las

alteraciones luminosas. De preferencia con respecto a una detección del tipo de Gram en función de la intensidad luminosa reflejaba, el medio nutritivo es opaco, lo que aumenta el grado de precisión de la detección. En particular, el medio opaco tiene un factor de reflectancia ρ inferior o igual a un 10 %, y de preferencia inferior o igual a un 5 %, y de manera incluso preferente inferior o igual a un 1 %. Por ejemplo, en medio de cultivo es una gelosa denominada « CPSO » (gelosa « CPS » que comprende SiO_2 para no pacificar el medio), una gelosa denominada « columbia » (o gelosa « CNA »), una gelosa Columbia con un 5 % de sangre del cordero (o gelosa denominada « COS »), una gelosa de Man, Rogosa, Sharpe (gelosa denominada « MRSM »), una gelosa de chocolate (gelosa denominada « PVX »), etc.

Dado que este tipo de crecimiento de las colonias es clásico, no se describirá con más en detalle en lo sucesivo, de forma ventajosa lo puede realizar un operario de forma manual o de forma automática con la ayuda de un automatismo de siembra de una manera conocida por sí misma. De manera ventajosa, la precipitación se realiza de modo que las colonias, sobre la base de las cuales se realiza la predicción del tipo de Gram, se separan las unas de las otras y de modo que la superficie de una colonia corresponda a una pluralidad de píxeles en la imagen adquirida con el dispositivo 12. Esto permite en particular facilitar su identificación posterior en la imagen adquirida.

Una vez que ha terminado el crecimiento de las colonias, la placa de Petri se abre, se coloca sobre el carro 28, las iluminaciones 24 y 26 se activan y se adquiere al menos una imagen hiperespectral *HSI* de la placa de Petri, en 34, con la ayuda del dispositivo de adquisición 12 y se memoriza en la unidad de tratamiento 14, que realiza un trámite informático para determinar el tipo de Gram de la cepa a partir de las imágenes adquiridas.

La unidad 14 comienza opcionalmente, en 36, mediante un tratamiento previo del ruido, que consiste en uno de los siguientes tratamientos o una combinación cualquiera de estos tratamientos:

a. una corrección del ruido del sensor de la cámara 18, en particular su offset, su ruido espacial, etc., de una manera conocida por sí misma;
b. un tratamiento de las reflexiones parasitarias, en particular especular que forma « surbrillos » en la imagen *HSI*. Por ejemplo, una determinación de umbral es realizada para eliminar los píxeles que tengan valores superiores a los de un umbral determinado previamente, por ejemplo, superiores o iguales a los dos tercios del valor máximo que pueden tomar los píxeles (es decir, superiores o iguales a 170 en el caso de los píxeles codificados en 8 bits entre 0 y 255);
c. un tratamiento ratiométrico que permite atenuar las variaciones de las imágenes provocadas por fluctuaciones exteriores tales como variaciones de la iluminación, dividiendo la imagen *HSI* entre una intensidad luminosa reflejaba a una longitud de onda que es invariable con el tipo de bacteria y el tipo de gelosa usada;
d. si se adquieren varias imágenes *HSI*, la búsqueda y la eliminación de los valores de píxeles aberrantes y/o la media de las imágenes adquiridas.

El tratamiento se mantiene, en 38, mediante la transformación de la imagen *HSI* tratada previamente, que memoriza valores de brillo a diferentes longitudes de onda, en una imagen hiperespectral de reflectancia con el fin de extraer la señal generada por la placa de Petri sola. Esto permite en particular filtrar las fluctuaciones del espectro de emisión de las fuentes de iluminación 24, 26. Por ejemplo, una corrección del tipo « *flat field correction* » (FFC) se realiza para obtener la reflectancia, lo que presenta además la ventaja de corregir las dispersiones de respuesta del sensor de píxel a píxel (dispersión de la corriente de oscuridad, dispersión de la ganancia, etc.). Esta transformación es por ejemplo una corrección de acuerdo con las relaciones:

$$\forall (i,j) \epsilon [1,N] \times [1,M], \forall \mathrm{p} \in [0,P]:$$

$$\begin{aligned} &Y_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) \\ &\quad = \frac{Rad_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) - B_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)}{W_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) - B_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)} \times m(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) \end{aligned} \quad (3)$$

en la que Y(λ) es una imagen de reflectancia, W es una imagen hiperespectral memorizada en la unidad 14 de un objeto neutro de reflectancia elevada e iluminado por las iluminaciones 24, 26, por ejemplo, una hoja de reflectancia uniforme superior a un 90 % (por ejemplo, una hoja denominada « blanca » o para una carta de gris inferior a un 10 %), y B es una imagen hiperespectral memorizada en la unidad 14 de un objeto neutro de baja reflectancia, por ejemplo la imagen de un capuchón negro que ocurra el objetivo 20 y $m(\lambda_{mí} + p \times \Delta\lambda = 1$ o igual a la media de la matriz $W(\lambda_{mí} + p \times \Delta\lambda) - B(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)$.

La unidad 14 usada en 40, después de la etapa 38 o en paralelo a las etapas precedentes, un algoritmo de identificación de las colonias de bacterias, por ejemplo, a partir de la imagen *HSI*(λ) o Y(λ). Todo algoritmo de reconocimiento de forma y de objeto clásico se puede usar para extraer una zona de la imagen, denominada « Col(λ) », que corresponde a una colonia. Por el contrario, esta selección se realiza de forma manual por un operario que selecciona esta zona ayudándose con la pantalla de visualización y con un mecanismo de recuento del

tipo ratón por ejemplo. A modo de ejemplo, la zona Col(λ) consiste en un listado de coordenadas de píxel que pertenecen a la colonia. Las zonas de píxeles seleccionadas son memorizadas por la unidad 14.
El método se mantiene, en 42, mediante el cálculo de una variable decisión $X_{col}(\lambda)$ en función de los píxeles de la imagen Y(λ) comprendida en la zona Col(λ), esta variable siendo aquella sobre la que tiene sí aplican las reglas de predicción del tipo de Gram. En una variante, la variable de decisión $X_{col}(\lambda)$ se basa únicamente en la imagen Y(λ). En otras variantes, la imagen Y(λ) se completa o se sustituye por uno u otros tipos varios de dimensiones calculadas en función de la imagen de reflectancia Y(λ), como se describirá con más detalle a continuación. En este sentido, un tratamiento de la imagen en reflectancia Y(λ) se realiza, opcionalmente. En particular, la unidad 14 calcula la una y/o la otra de las siguientes dimensiones:

i. una imagen en absorbancia A(λ), por ejemplo por medio de la transformada de Beer-Lamber (relación (4)) o de la transformada de Kubelka-Munk (relación (5)). Sin quedar ligado por la teoría, los inventores son de la opinión de que las bacterias de Gram negativo son diferentes a las bacterias de Gram positivo por un contenido más elevado de citocromos que son absorbentes en el intervalo de [415-440] nm, lo que permite caracterizar la transformación en imagen de absorbancia.

$$\forall (i,j) \epsilon [1,N] \times [1,M], \forall \mathrm{p} \in [0,P]:$$

$$\mathrm{A}_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) = log\left(\frac{1}{\mathrm{Y}_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)}\right) \qquad (4)$$

$$\mathrm{A}_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) = \frac{\left(1 - \mathrm{A}_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)\right)^2}{2 \times \mathrm{A}_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)} \qquad (5)$$

ii. una imagen en reflectancia Y(λ) normalizada o una imagen en absorbancia A(λ) normalizada con el fin de reducir las ahí habilidades debidas a los efectos ópticos. Por ejemplo, la unidad usa una normalización por zona (conocida con el nombre de « Area normalization »), una normalización por vector unitario (conocida con el nombre de « Unit vector normalization »), una normalización media (conocida con el nombre de « Mean normalization »), una normalización por máximo (conocida con el nombre de « Maximum normalization »), una normalización por intervalo (conocida con el nombre de « Range normalization ») o una normalización por pico (conocida con el nombre de « Peak normalization »). Estas normalizaciones se describen por ejemplo en el documento de K. Varmuza y P. Filzmoser, "Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics", CRC Press, 2009 y en el documento de A. Rinnan, F. van den Berg y S. Engelsen, "Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra", Trends in Analytical Chemistry, vol. 28, n.º 10, 2009.

iii. la derivada primera $\frac{\partial}{\partial\lambda}$ o segunda $\frac{\partial^2}{\partial\lambda^2}$ en la longitud de onda de la imagen en reflectancia Y(λ), normalizada o no, o de la imagen en absorbancia A(λ), normalizada o no, con el fin de acentuar los cambios de comportamiento en el espectro y reducir las líneas de base. De preferencia, un algoritmo del filtrado local polinómico se usa para reducir la propagación de error, de forma ventajosa un algoritmo tal como se describe en el documento de A. Savitzky y M.J.E. Golay « Smoothing and differentialtion of data by simplified least squares procédures », Anal. Chem., vol.36, pp.1627-1639, 1964.

El tipo de Gram de cada colonia a continuación se predice en 44 mediante la unidad 14 en función de la variable $X_{col}(\lambda)$ aplicando reglas de decisión definidas previamente, cuyas variables se describen a continuación. El tipo de Gram predichos se memoriza en la unidad 44 y/o se presenta sobre una pantalla. Esta predicción se produce por ejemplo mediante otro instrumento de análisis microbiano para una etapa posterior de identificación/caracterización de la colonia.

A. ENFOQUE MONO-CANAL

En una primera variante, se realiza un enfoque mono-variable y mono-canal con la unidad 14. De acuerdo con este enfoque, la variable de decisión $X_{col}(\lambda)$ se resume en un único valor tomado a una longitud de onda definida previamente λ_c en el intervalo de longitudes de onda de 415 nm-440 nm, por ejemplo, la reflectancia de la colonia (normalizada o no), o la absorbancia de la colonia (normalizada o no), o la derivada primera o la derivada segunda de la misma.

En una primera variante basada en la reflectancia, la unidad 14 calcula, en 42, un espectro en reflectancia de la colonia, por ejemplo, un espectro medio con respecto al los píxeles de la colonia de acuerdo con la relación:

$$\forall p \in [0, P]: Y_{col}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) = \frac{1}{N_{col}} \times \sum_{(i,j)\in \mathrm{Col}(\lambda)} Y_{i,j}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda) \qquad (6)$$

en la que N_{col} es el número de píxeles de la zona Col(λ). La variable de decisión $X_{col}(\lambda)$ entonces es igual a $Y_{col}(\lambda_c)$. La unidad 14 también calcula un error de medición de la colonia a la longitud de onda λ_c, en particular la desviación estándar, denominada « SD », del conjunto de los valores $Y_{i,j}(\lambda_c)$ de los píxeles que pertenecen a la zona de píxeles Col(λ).

En 44, la unidad 44 entonces aplica las siguientes reglas de comparación al valor del espectro $Y_{col}(\lambda_c)$:

$$\text{si } Y_{col}(\lambda_c) < Y_{GN_{máx}}(\lambda_c) + SD \text{ entonces la colonia es de Gram negativo} \qquad (7)$$

$$\text{si } Y_{col}(\lambda_c) > Y_{GP_{mín}}(\lambda_c) - SD \text{ entonces la colonia es de Gram positivo} \qquad (8)$$

$$\text{si } Y_{col}(\lambda_c) \in \left[Y_{GP_{mín}}(\lambda_c) - SD; Y_{GN_{max}}(\lambda_c) + SD\right] \text{ entonces el Gram es indeterminado} \qquad (9)$$

en los que $Y_{GNmáx}(\lambda_c)$ e $Y_{GPmín}(\lambda_c)$ son dos umbrales definidos previamente, que dependen preferentemente del medio de cultivo que se memorizan en la unidad 14. Por el contrario, el error de medición SD se puede elegir para que sea nulo.

La figura 3A ilustra espectros medios $Y_{col}(\lambda)$ de colonias que han crecido sobre un medio transparente (en el presente documento CPSE), a saber 10 cepas de Gram negativo (« GN ») (*Escherichia coli* (3 cepas), *Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, Providencia stuartii, Serratia marcescens, K. pneumoniae, Morganella morganii, Citrobacter freundii*) y 10 cepas de Gram positivo (« GP ») (*Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis* (2 cepas), *Streptococcus agalactiae, Staphylococcus saprophyticus* (2 cepas), *Streptococcus agalactiae, Enterococcus faecium, Streptococcus agalactiae*). La figura 3B es una lista con más detalle del intervalo de 415-440 nm. Las figuras 4A y 4B ilustran estos mismos espectros pero para cepas que han crecido sobre un medio opaco (en el presente documento CPSO, diferente a CPSE porque contiene partículas de SiO_2). Como se puede observar en estos ejemplos, al menos en el intervalo de 415-440 nm, los dos tipos de Gram se distinguen el uno del otro, la diferenciar siendo incluso muy marcada para el medio opaco. En particular, en el intervalo de 415-440 nm, se observa que los espectros de las bacterias de Gram negativo son inferiores a los espectros de las bacterias de Gram positivo.

La primera variante se sometió a ensayo en 30 cepas bacterianas, cultivadas para cada medio de cultivo, entre los implicados con más frecuencia en las infecciones clínicas, a saber (número de cepas por especie entre paréntesis):

- para el Gram negativo: *Escherichia coli* (1), *K. pneumoniae* (1), *Klebsiella oxytoca* (1), *Proteus mirabilis* (1), *Morganella morganii* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (1), *Acinetobacter baumanii* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Serratia marcescens* (1), *Citrobacter koseri* (1), *Enterobacter aerogenes* (1), *Moraxella catarrhalis* (1), *Hafnia alvei* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Haemophilus influenzae* (1);
- para el Gram positivo: *Corynebacterium jeikeium* (1), *Corynebacterium amycolatum* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Enterococcus faecium* (1), *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Staphylococcus haemolyticus* (1), *Staphylococcus hominis* (1), *Streptococcus pneumoniae* (1), *Streptococcus agalactiae* (1), *Streptococcus pyogenes* (1), *Streptococcus anginosus* (1), *Streptococcus viridans* (1).

Para cada canal λ del intervalo de 415-440 nm, se determina el mínimo $Y_{GPmín}(\lambda)$ de los espectros al valor λ de las cepas de Gram positivo. Además, se determina el máximo $Y_{GNmáx}(\lambda)$ de los espectros al valor λ de las cepas de Gram negativo. El canal λ_c retenido por el medio de cultivo entonces es el que maximiza el intervalo [$Y_{GPmín}(\lambda_c)$; $Y_{GNmáx}(\lambda_c)$], y los umbrales definidos previamente retenidos por los medios son respectivamente los valores de $Y_{GPmín}(\lambda_c)$ e $Y_{GNmax}(\lambda_c)$. Para el medio CPSE, el tipo de Gram de 19 cepas de especies idénticas a las que se han enumerado anteriormente, de las cuales 10 son de Gram positivo y 9 de Gram positivo, se predijo con una tasa de éxito de aproximadamente un 90 %. Para el medio CPSO, el éxito sobre estas mismas cepas es de un 100 %.

En una segunda variante basada en la derivada primera de la reflectancia, la unidad 14 calcula, en 42, un espectro de reflectancia de la colonia, por ejemplo, un espectro medio $Y_{col}(\lambda)$ con respecto a los píxeles de la colonia tal como se ha descrito anteriormente, y a continuación se calcula la derivada primera $\frac{\partial Y_{col}}{\partial \lambda}(\lambda_c)$. del espectro medio. La

variable de decisión $X_{col}(\lambda)$ entonces es igual a $\frac{\partial Y_{col}}{\partial \lambda}(\lambda_c)$. En 44, la unidad 14 aplica un modelo de predicción a dicha variable, por ejemplo un modelo lineal discriminan que de acuerdo con las relaciones:

$$Gram = b + a \times \frac{\partial Y_{col}}{\partial \lambda}(\lambda_c) \qquad (10)$$

$$\text{Si } Gram < 0{,}5 \text{ entonces la colonia es de Gram negativo} \qquad (11)$$

$$\text{Si } Gram > 0{,}5 \text{ entonces la colonia es de Gram positivo} \qquad (12)$$

en las que el de *Gram* es una puntuación, los parámetros a y b son coeficientes definidos previamente memorizados en la unidad 14, y que dependen preferentemente del medio de cultivo.

La segunda variante se sometió a ensayo en 52 cepas, 28 de Gram negativo y 24 de Gram positivos, que pertenecen a 19 especies diferentes entre las implicadas con más frecuencia en las infecciones clínicas, a saber (número de cepas por especie entre paréntesis):

- para el Gram negativo: *Escherichia coli* (9), *Klebsiella pneumoniae* (3), Enterobacter cloacae (1), *Serratia Marcescens* (2), *Citrobacter freundii* (2), *Proteus mirabilis* (2), *Providencia stuartii* (1), *Morganella morganii* (2);
- para el Gram positivo: *Staphylococcus saprophyticus* (9), *Streptococcus agalactiae* (7), *Enterococcus faecium* (3), *Enterococcus faecalis* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Candida albicans* (1).

La figura 5 ilustra el modelo de aprendizaje de la relación (10), al Gram negativo observado se le va a asignar el valor 0 y al Gram positivo se le va a asignar el valor 1. Una regresión lineal entre los Gram observados y predichos se realiza para la determinación de los parámetros a y b de una manera conocida por sí misma. El modelo se estudió para cada longitud de onda del intervalo de 400-900 nm, y la figura 6 ilustra el coeficiente de correlación en función de la longitud de onda para un medio de cultivo transparente (en el presente documento CPSE). El máximo de este correlograma corresponde a la longitud de onda λ_c y de ese modo se observa que el carácter discrimínante del intervalo de 415-440 nm se encuentra automáticamente mediante regresión lineal, con λ_c siendo el efecto igual a 415,3 nanómetros. La figura 7 ilustra el Gram predicho en función del Gram conocido a partir de las cepas que se han descrito anteriormente para el medio CPSE, la tasa de éxito siendo superior a un 80 %. La tasa de éxito para un medio opaco es además de un 100 %. Se sometieron a ensayo varias variables de decisión, con la tabla de la figura 8 enumerando a las mismas. Parece que las derivadas primera y segunda de la reflectancia no normalizada son las variables que llevan a la tasa de éxito más elevada, la derivada primera siendo sin embargo preferente de acuerdo con el principio de parsimonia.

B. <u>ENFOQUE MULTI-CANAL</u>

De acuerdo con este enfoque, se usa en varios canales del intervalo de longitudes de onda de 415-440 nm, de forma ventajosa y opcionalmente en combinación con canales del intervalo de 750-800 nm. La variable de decisión es $X_{col}(\lambda)$ que es por ejemplo el espectro medio de reflectancia (normalizado o no), de absorbancia (normalizada o no), la derivada primera o la derivada segunda con respecto al conjunto del intervalo de 400-900 nm.

De acuerdo con una primera variante, y por las razones que se han mencionado anteriormente, se usa la derivada primera de la reflectancia no normalizada. La unidad 14 calcula por lo tanto, en 42, la derivada primera $\frac{\partial Y_{col}(\lambda)}{\partial \lambda}$ del espectro medio $Y_{col}(\lambda)$ con respecto al intervalo de 400-900 nm, como se ha descrito anteriormente, esta derivada constituyendo la variable de decisión $X_{col}(\lambda)$. En 44, la unidad 14 aplica un modelo de predicción a dicha variable, por ejemplo un modelo lineal de acuerdo con las relaciones:

$$Gram = b + \sum_{p \in [0,P]} a_p \times \frac{\partial Y_{col}(\lambda_{mín} + p \times \Delta\lambda)}{\partial \lambda} \qquad (13)$$

$$\text{Si } Gram < 0{,}5 \text{ entonces la colonia es de Gram negativo} \qquad (14)$$

$$\text{Si } Gram > 0{,}5 \text{ entonces la colonia es de Gram positivo} \qquad (15)$$

en las que *Gram* es una puntuación, los parámetros a_p y *b* son coeficientes definidos previamente memorizados en la unidad 14, y que dependen preferentemente del medio de cultivo. El modelo de predicción de la relación (13) se informa de manera similar a la que se ha descrito anteriormente, mediante regresión lineal. La figura 9 ilustra el Gram predicho en función del Gram observado para el medio CPSE. Para este último, la tasa de correlaciones de un 95 %. La figura 10 ilustrados coeficientes a_p. Aquí se observa que el modelo de predicción usa dos intervalos principales de longitudes de onda en el modelo de predicción, a saber el intervalo de 415-440 nm, y más particularmente el intervalo de 421-436 nm, y en el intervalo de 750-800 nm. Por lo tanto se observa que el intervalo de 750-800 nm también comprende informaciones espectrales discriminantes con respecto al tipo de Gram de las bacterias.

De acuerdo con una segunda variante, la variable de decisión es multi-canal y también de múltiples píxeles, la información espectral de cada píxel de la colonia siendo usado, y no va quemado como media como se ha descrito anteriormente. A diferencia del término « media », la información espectral asociada a un píxel se designa con el término de « individual ». En particular, la variable de decisión es $X_{col}(\lambda)$ y está constituida por el conjunto de los espectros individuales de reflectancia (normalizada o no), de absorbancia (normalizada uno), de sus derivadas primeras o de sus derivadas segundas, de los píxeles de la zona Col(λ).

Por ejemplo, teniendo en cuenta los espectros de reflectancia $\{Y_{i,j}(\lambda)\}_{(i,j)\epsilon Col(\lambda)}$ normalizados (por ejemplo, dividiendo cada espectro individual entre su norma euclidiana) con respecto al intervalo de 400-900 nm, la unidad 14 usa, en 44, una regla de predicción basada en una clasificación de dos clases (es decir, el Gram positivo, asignado por ejemplo a los valores positivos, y el Gram negativo, asignado por ejemplo a los valores negativos) de acuerdo con las relaciones:

$$Gram = X_{col}(\lambda).\hat{\beta} \qquad (16)$$

$$\text{Si } Npos(Gram) > Nneg(Gram), \text{ entonces la colonia es de Gram positivo} \qquad (17)$$

$$\text{Si } Npos(Gram) < Nneg(Gram), \text{ entonces la colonia es de Gram negativo} \qquad (18)$$

en las que Gram es un vector de tamaño igual al número *P* de canales en el intervalo de 400-900 nm, $X_{col}(\lambda)$ aquí es una matriz cuyas líneas son respectivamente iguales a los espectros individuales de reflectancia $\{Y_{i,j}(\lambda)\}_{(i,j)\epsilon Col(\lambda)}$ normalizados, $\hat{\beta}$ es un rector de la columna definida previamente de tamaño igual a *P*, *Npos*(*Gram*) es el número de componentes del vector *Gram* que son positivos y *Nneg(Gram*) es el número de componentes del vector *Gram* que son negativos. Los parámetros $\hat{\beta}$ y β_0, memorizados en la unidad 14, dependen preferentemente del medio de cultivo. La predicción, basada en un voto mayoritario, se puede realizar por el contrario sobre la media del vector $\hat{\beta}$, el Gram negativo siendo predicho si esta media es negativa y el de Gram positivo siendo predicho si esta medida es positiva.

En un primer ejemplo, el modelo de predicción de la relación (14) se informa sobre los píxeles de 52 cepas que se han descrito precedentemente resolviendo un problema de optimización de tipo SVM (para « Support Vector Machine ») de acuerdo con las siguientes relaciones:

$$\hat{\beta} = \arg \min_{\beta,\xi_m} \left(\frac{1}{2} \|\beta\|^2 + C \sum_{m=1}^{M} \xi_m \right) \qquad (19)$$

con las limitaciones:

$$\forall \mathrm{m} \in [1, M]: \xi_m \geq 0 \qquad (21)$$

$$\forall \mathrm{m} \in [1, M]: q_m(\, Y_m(\lambda).\beta) \geq 1 - \xi_m \qquad (22)$$

$$\|\beta\|^2 + C \sum_{m=1}^{M} \xi_m$$

en las que *N* es el número de espectros individuales de reflectancia normalizados, indicados como $Y_m(\lambda)$, usados para el aprendizaje, numerados de 1 a M, $q_m \in \{-1, 1\}$ con $q_m = 1$ si el m^{ésimo} espectro está asociado a una bacteria de Gram positivo, y $q_m = -1$ el m^{ésimo} espectro está asociado a una bacteria de Gram negativo, y *C* es un escalar definido previamente.

El modelo se validó sobre 10 cepas de Gram negativo (*Escherichia coli* (3 cepas), *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis, Providencia stuartii, Serratia marcescens, K. pneumoniae, Morganella morganii, Citrobacter freundii*) y 10 cepas de Gram positivo (*Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis* (2 cepas), *Streptococcus agalactiae, Staphylococcus saprophyticus* (2 cepas), Str*eptococcus agalactiae, Enterococcus faecium, Streptococcus agalactiae*). Para un medio opaco (por ejemplo, CPSO), la tasa de éxito es de un 100 %. Para un medio transparente (por ejemplo, CPSE), la tasa de éxito es de aproximadamente un 94 % para las bacterias de Gram negativo y de aproximadamente un 98 % para las bacterias de Gram positivo. Como se puede observar en la figura 10, que ilustran los componentes del vector $\hat{\beta}$en función de los canales, la predicción basada en la clasificación SVM no dejaba aparecer un intervalo particular de longitudes de onda.

En un segundo ejemplo, el modelo de predicción de la relación (14), con a se informó sobre los píxeles de las 52 cepas que se han descrito anteriormente resolviendo un problema de optimización de tipo « Fused Lasso » de acuerdo con la siguiente relación:

$$\hat{\beta} = \arg\min_{\beta}\left(\|q_m - Y_m(\lambda)\|_2^2 + \mu_1 \sum_{p=1}^{P} |\beta_p| + \mu_2 \sum_{p=1}^{P-1} |\beta_{p+1} - \beta_p| \right) \qquad (23)$$

en la que μ_1 y μ_2 son dos parámetros que regulan respectivamente la parsimonia del modelo (es decir, el número de componentes de $\hat{\beta}$que no son nulos) y la regularidad del modelo (es decir, la variabilidad entre los componentes sucesivos de $\hat{\beta}$). Como es visible en la figura 12, cuando la parsimonia y la regularidad se fuerza durante el aprendizaje de $\hat{\beta}$(μ_1 = 0,0001 y μ_2 = 0,0025), los componentes de $\hat{\beta}$no nulos retenidos automáticamente son los de los intervalos de 415-440 nm y de 750-800 nm. La tasa de éxito es de un 100 % para un medio opaco (por ejemplo, CPSO). Y para un medio transparente (por ejemplo, CPSE), la tasa de éxito es de un 92 % para el Gram positivo y de un 84 % para el Gram negativo.

Se ha descrito una adquisición con la ayuda de una cámara hiperespectral en el intervalo de 400-900 nm. Evidentemente, la invención se aplica también a una adquisición realizada mediante una cámara multiespectral que adquiere espectros en dos intervalos separados que comprenden, o que consisten en, respectivamente en los intervalos de 415-440 nm y de 750-800 nm. Además, la invención se aplica a dos cámaras distintas configuradas para adquirir respectivamente estos intervalos.

Se ha descrito una adquisición en un intervalo superior al intervalo de 415-440 nm, en particular una adquisición en el intervalo de 750-800 nm que comprende informaciones espectrales discriminantes con respecto al tipo de Gram de las bacterias. Por el contrario, la adquisición se realiza únicamente en el intervalo de 400-500 nm, más preferentemente en el intervalo de 415-440 nm, y la predicción del tipo de Gram se realiza únicamente en función de las informaciones espectrales de este intervalo. Evidentemente, la invención se aplica a cualquier intervalo de adquisición que comprende intervalo de 415-440 nm, combinado con un tratamiento realizado únicamente sobre este intervalo para predecir el tipo de Gram.

Se ha descrito la adquisición de imágenes, es decir, la adquisición de informaciones espaciales y espectrales. Aunque evidentemente, la invención también se aplica a la adquisición de informaciones únicamente espectrales, por ejemplo, con la ayuda de un micro-espectroscopio. Por ejemplo, una colonia se puede localizar previamente con la ayuda de un sistema de formación de imágenes convencional o mediante un operario, y a continuación un espectro de reflexión o de transmisión emitido por la colonia se adquiere mediante micro-espectroscopía y se trata para predecir el tipo de Gram.

Se han descrito dos medios de cultivo, el CPSE (transparente) y el CPSO (opaco). Otros medios de cultivo se sometieron a ensayo llevando a resultados análogos. Por ejemplo en las figuras 13A y 13B, se observa, sobre un medio de los medios de cultivo TSA (gelosa tripto-caseína soja) y MH2 (gelosa de Mueller Hinton 2) que el Gram positivo y el Gram negativo se distinguen el uno del otro al menos en el intervalo de 415-440 nm. Como se ha descrito ampliamente, los medios opacos son preferentes ya que facilitan la petición del tipo de Gram. La invención por lo tanto se aplica a cualquier tipo de medio de cultivo transparente y no coloreado, por ejemplo, los del estado de la técnica, al que se le añade un agente de opacidad, por ejemplo partículas de SiO_2.

Se han descrito diferentes predicciones (determinación de umbrales, modelo lineal, SVM, Lasso). Desde luego, la invención se aplica a cualquier tipo de tratamiento que permita clasificar mediciones en dos clases (Gram positivo y Gram negativo), por ejemplo un algoritmo de comparación de espectros (por ejemplo, un método de centroide), una

clasificación a base de red de neuronas, una clasificación a base de árbol (por ejemplo, algoritmo CART, para « classification and regresssion tree »), etc. Tales métodos son por ejemplo los que se describen en el documento de Eric Laloum, « Une méthode chimiométrique originale d'identification de produits par spectroscopie proche infrarouge », Spectra Analyse, vol.33, n.º 237, 2004.

Se han descrito modos de realización a base de espectro de reflexión. Por el contrario, el espectro se adquiere en transmisión, aplicándose los tratamientos que se han descrito anteriormente para la predicción del tipo de Gram.

REIVINDICACIONES

1. Detección del tipo de Gram de una cepa bacteriana, que comprende:

- la iluminación en el intervalo de longitudes de onda de 415 nm-440 nm de al menos una bacteria de dicha cepa que tiene una respuesta electromagnética natural en dicho intervalo;
- la adquisición, en el intervalo de 415 nm-440 nm, de una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y
- la determinación del tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en el intervalo de 415 nm-440 nm.

2. Detección del tipo de Gram de una bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha bacteria también tiene una respuesta electromagnética natural en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm, y en el que:

- la iluminación de dicha bacteria también se realiza en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm;
- la adquisición de una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, la bacteria iluminada también se realiza en el intervalo de 750-800 nm; y
- la determinación del tipo de Gram la cepa bacteriana se realiza en función de las intensidades luminosas adquiridas en dichos intervalos de 415 nm-440 nm y de 750 nm-800 nm.

3. Detección de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la determinación del tipo de Gram comprende:

- el cálculo de un factor de reflectancia o de absorción de dicha bacteria iluminada en función de la intensidad luminosa adquirida;
- la determinación del tipo de Gram en función del factor de reflectancia o de absorción calculado.

4. Detección de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la determinación del tipo de Gram comprende:

- el cálculo de una derivada primera en la longitud de onda del factor de reflectancia o de absorción calculado;
- la determinación del tipo de Gram en función de la derivada primera calculada.

5. Detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la determinación del tipo de Gram se realiza en función de la intensidad luminosa a una longitud de onda única del intervalo de 415 nm-440 nm, en particular la longitud de onda de 420 nm.

6. Detección de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la determinación del tipo de Gram comprende:

- la comparación de un valor igual a la intensidad luminosa a 420 nm, o calculado a partir del mismo, con un primer y segundo umbrales determinados previamente separando la tinción de Gram positivo de la tinción de Gram negativo, el primer umbral siendo superior al segundo umbral;
- la determinación del Gram negativo si dicho valor es superior al primer umbral y la determinación del Gram positivo si dicho valor es inferior al segundo umbral.

7. Detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la determinación del tipo de Gram comprende la aplicación de una predicción lineal determinada previamente que relaciona la intensidad luminosa adquirida, o un valor calculado a partir de la misma, con el tipo de Gram, seguido por una determinación del umbral del resultado de la predicción lineal aplicada.

8. Detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la determinación del tipo de Gram comprende la aplicación de una clasificación de dos clases de tipo SVM a la intensidad luminosa adquirida, o a un valor calculado a partir de la misma.

9. Detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la iluminación y la adquisición se realizan directamente sobre una muestra de ensayo que comprende una colonia de la cepa bacteriana y un medio nutritivo en el que ha crecido dicha colonia.

10. Detección de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la determinación del tipo de Gram se realiza en función de dicho medio nutritivo.

11. Detección de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que el medio nutritivo es un sustrato opaco en la superficie del cual ha crecido la colonia, dicho sustrato teniendo de preferencia una reflectancia ρ inferior o igual a un 10 %, de preferencia inferior o igual a un 5 %.

12. Detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la adquisición de la intensidad luminosa comprende la adquisición de una imagen hiperespectral o multiespectral de una colonia de

bacterias de la cepa, y en la que la intensidad luminosa se determina en función de al menos un píxel de dicha imagen que corresponde a la colonia.

13. Detección de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la intensidad luminosa es igual a la media de píxeles de dicha imagen que corresponde a la colonia.

14. Sistema de detección del tipo de Gram de una cepa bacteriana, que comprende:

- una iluminación configurada para iluminar, en el intervalo de longitudes de onda de 415 nm-440 nm, al menos una bacteria de la cepa;
- un sensor configurado para adquirir, en el intervalo de 415 nm-440 nm, una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y
- una unidad informática configurada para determinar el tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en el intervalo de 415 nm-440 nm.

15. Sistema de acuerdo con la reivindicación 14, en el que:

- la iluminación se configura para iluminar dicha bacteria en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm;
- el sensor se configura para adquirir, en el intervalo de longitudes de onda de 750 nm-800 nm, una intensidad luminosa reflejada por, o transmitida a través de, dicha bacteria iluminada; y
- la unidad informática se configura para determinar el tipo de Gram de la cepa bacteriana en función de la intensidad luminosa adquirida en dichos intervalos de 415 nm-440 nm y de 750 nm-800 nm.

16. Sistema de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, configurado para iluminar, y adquirir la imagen de, una muestra de ensayo que comprende una colonia de bacterias de dicha cepa y medio nutritivo en el que ha crecido dicha colonia, en particular una placa de Petri.

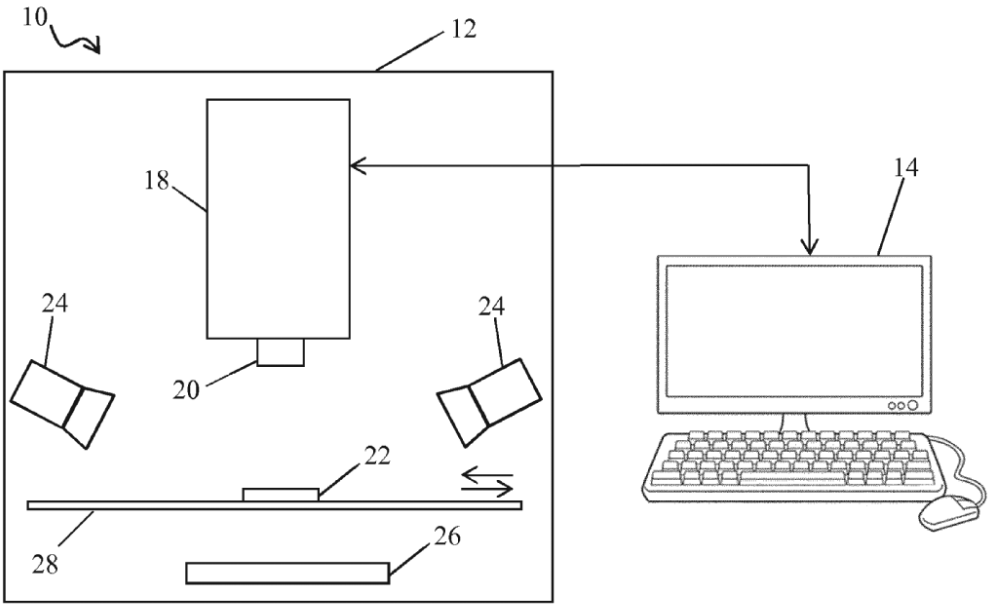

Figura 1

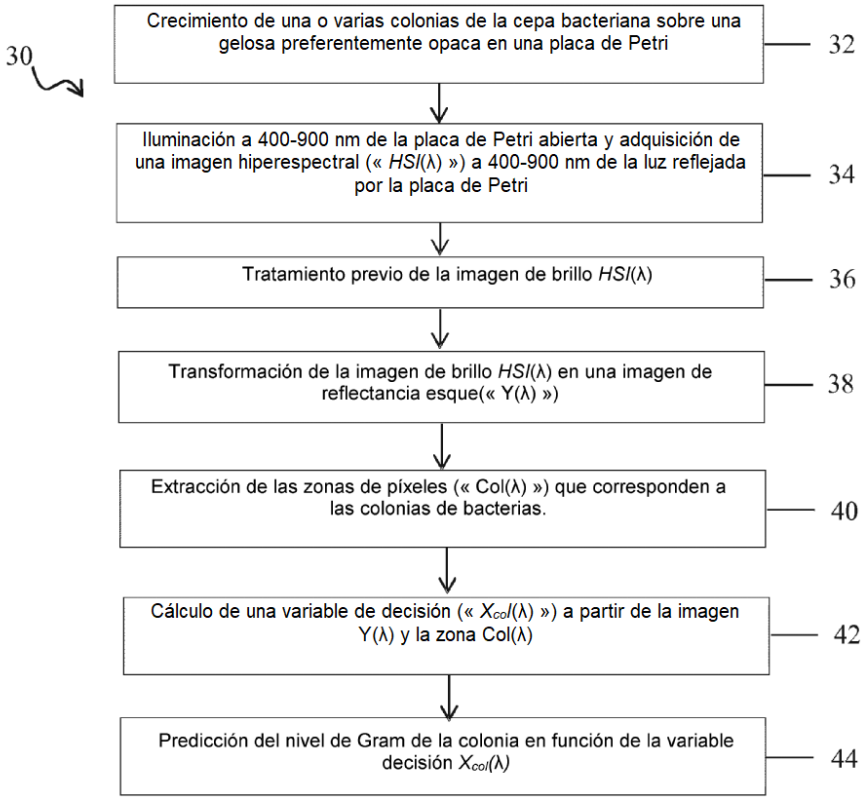

Figura 2

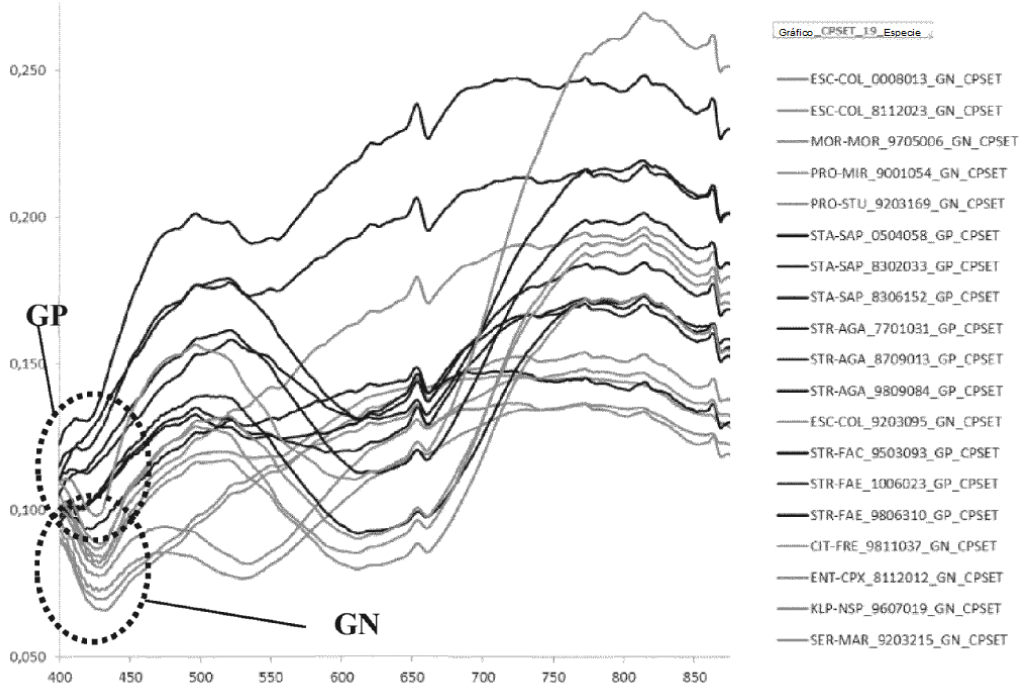

Figura 3A (CPSE)

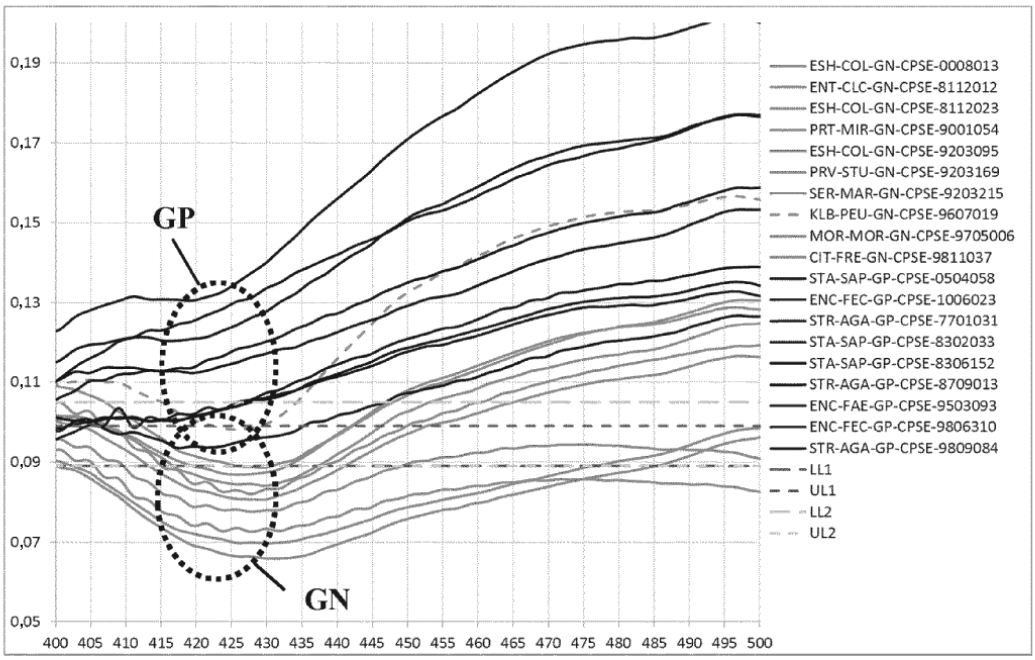

Figura 3B (CPSE)

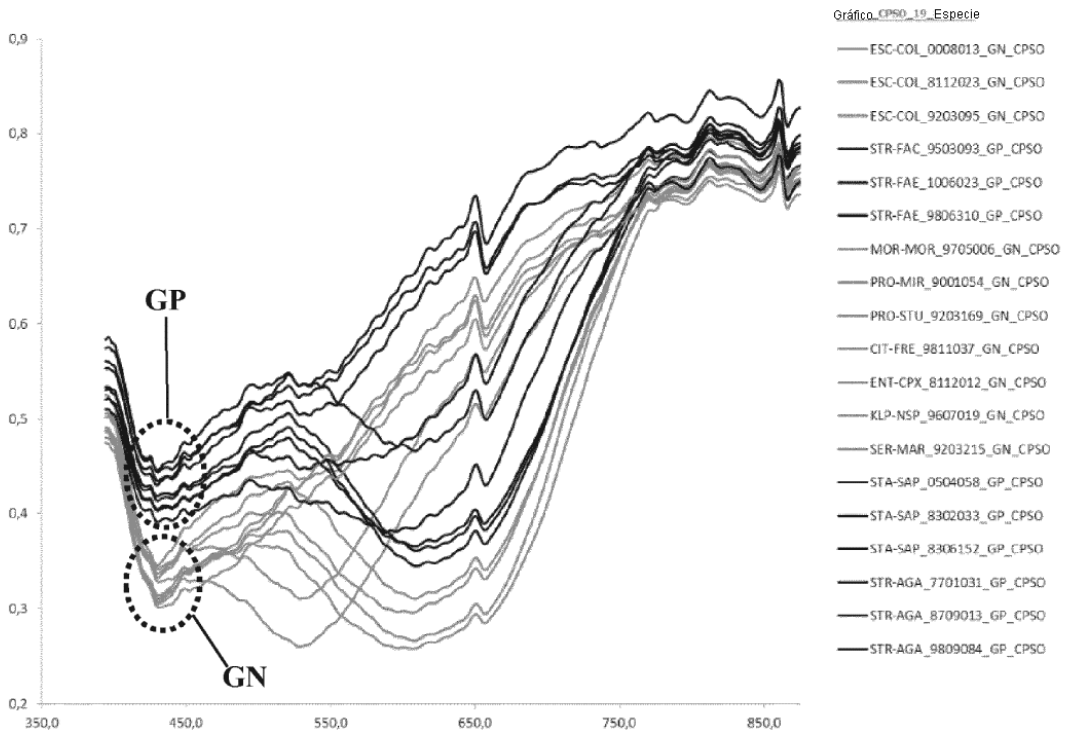

Figura 4A (CPSO)

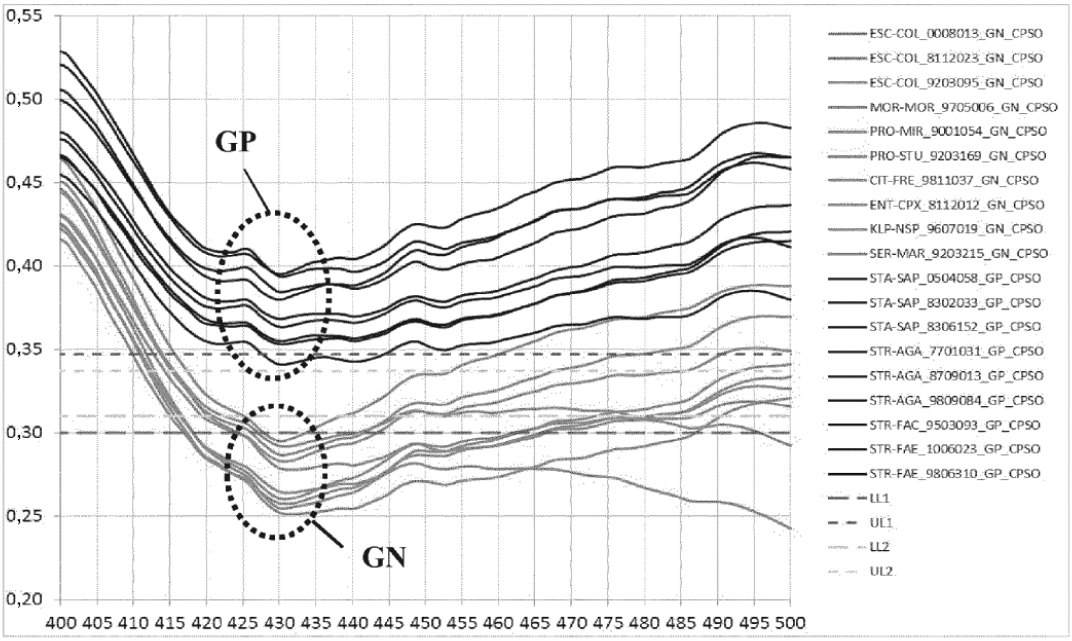

Figura 4B (CPSO)

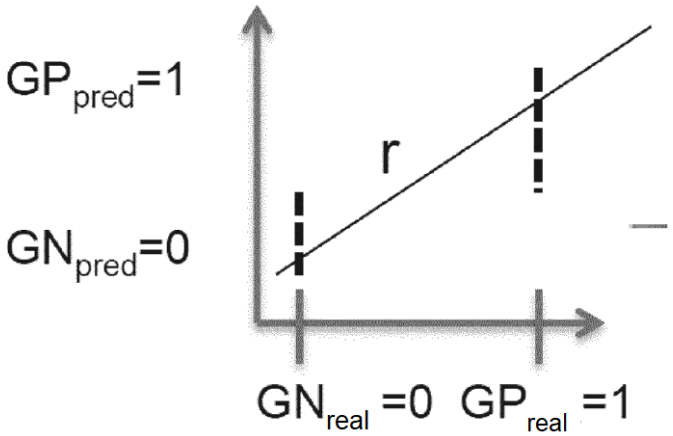

Figura 5

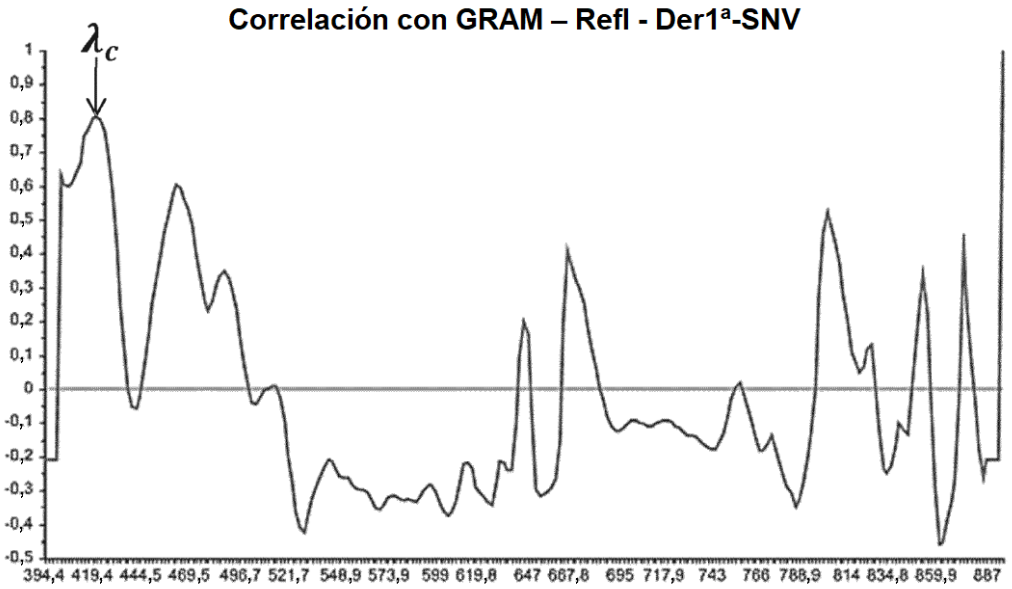

Figura 6

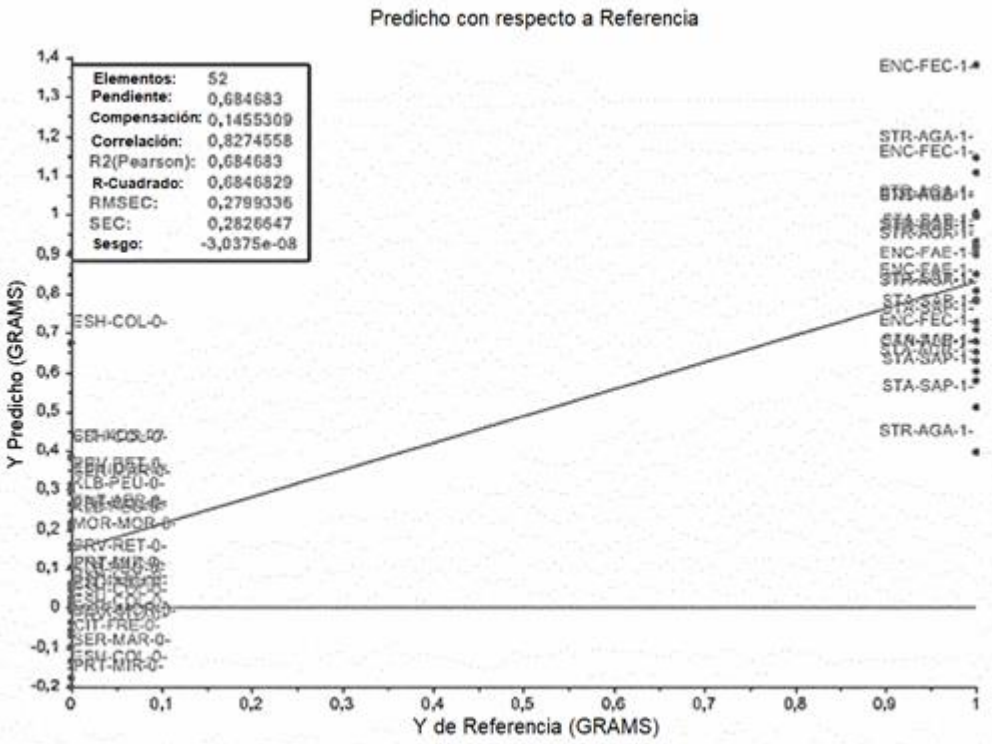

Figura 7

Procesamiento previo espectral	Valor de correlación máximo	Longitud de onda λ_c (nm)
Reflectancia (Sin Procesar)	0,65	428
Absorbancia (Log 1/R)	-0,66	427,8
Reflectancia - Der 1ª (SG)	0,83	415,3
Reflectancia - Der 2ª (SG)	-0,79	434,1
Absorbancia - Der 1ª (SG)	-0,84	417,4
Absorbancia - Der 2ª (SG)	0,86	434,1
Reflectancia SNV	-0,58	396,5
Área de Reflectancia Normalizada	0,76	432
Vector de Reflectancia Normalizado	0,77	432
Área de Absorbancia Normalizada	-0,6	432
Vector de Absorbancia Normalizado	-0,59	432
Reflectancia - Der 1ª - Vector Norm	0,8	421,5
Reflectancia - Vector Norm - Der 1ª	0,83	421,5
Reflectancia - Der 1ª - SNV	0,8	421,5

Figura 8

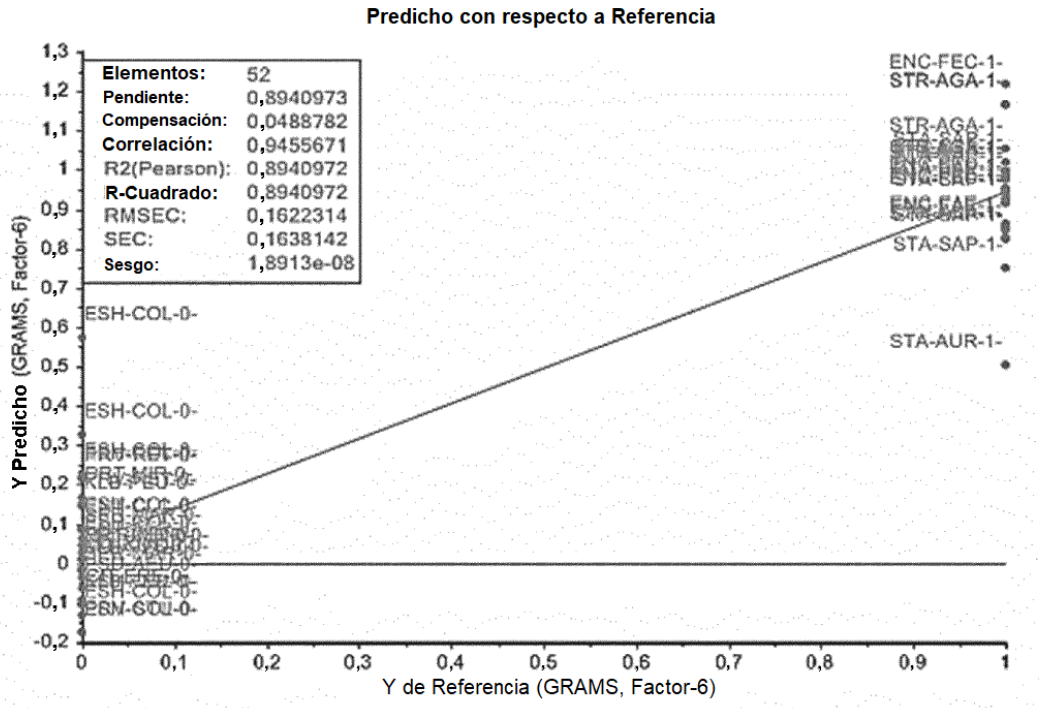

Figura 9

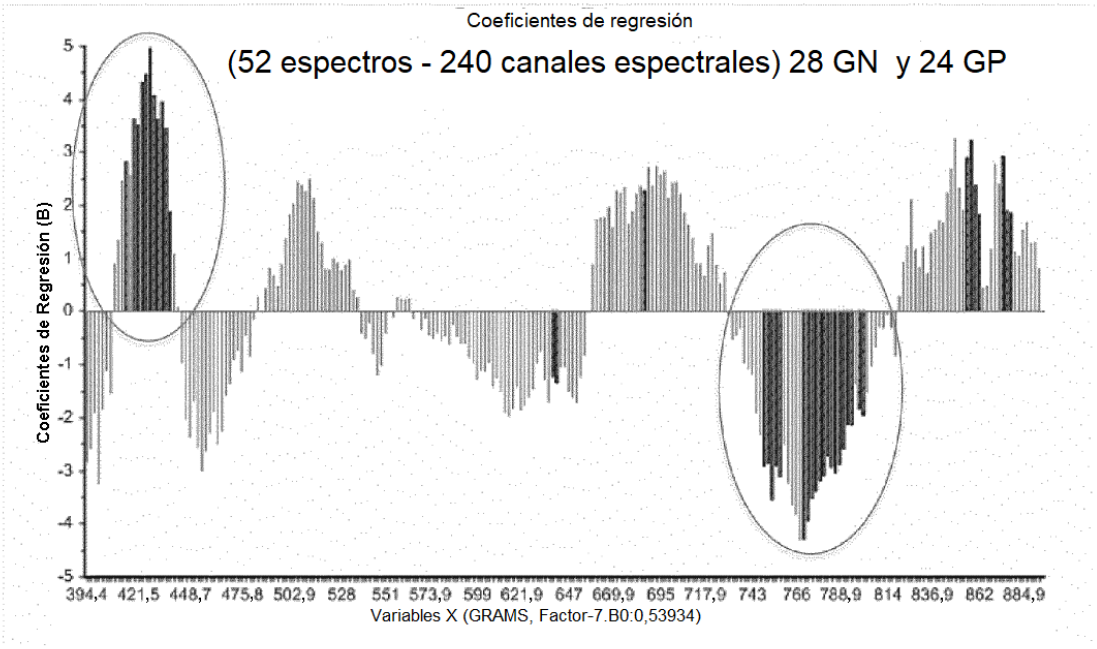

Figura 10

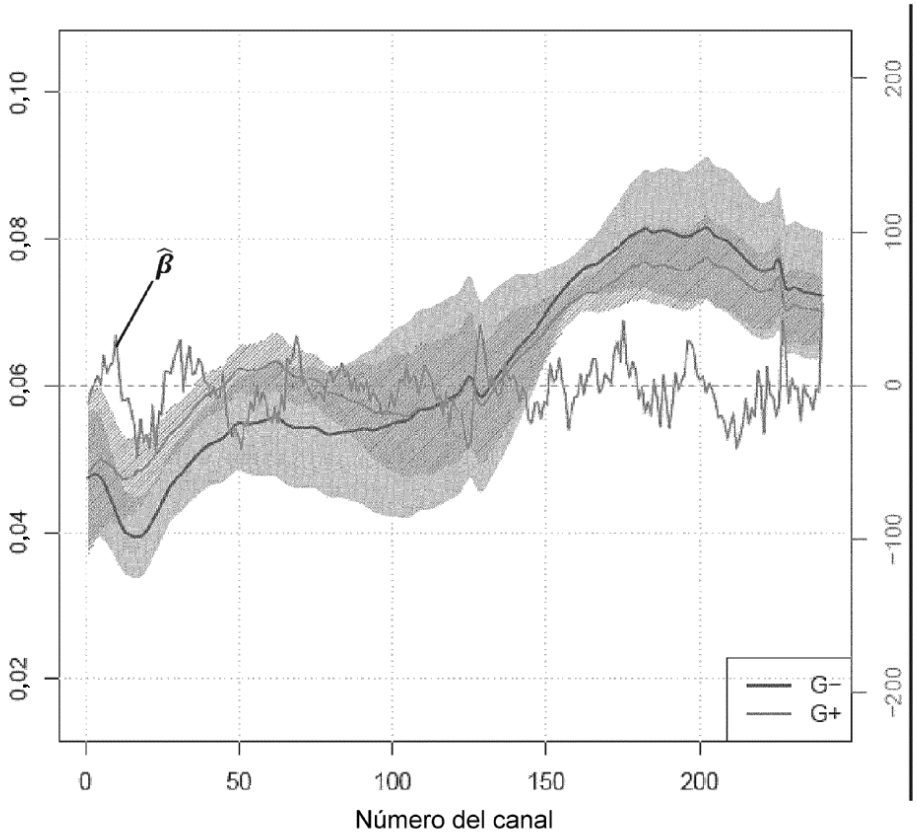

Figura 11

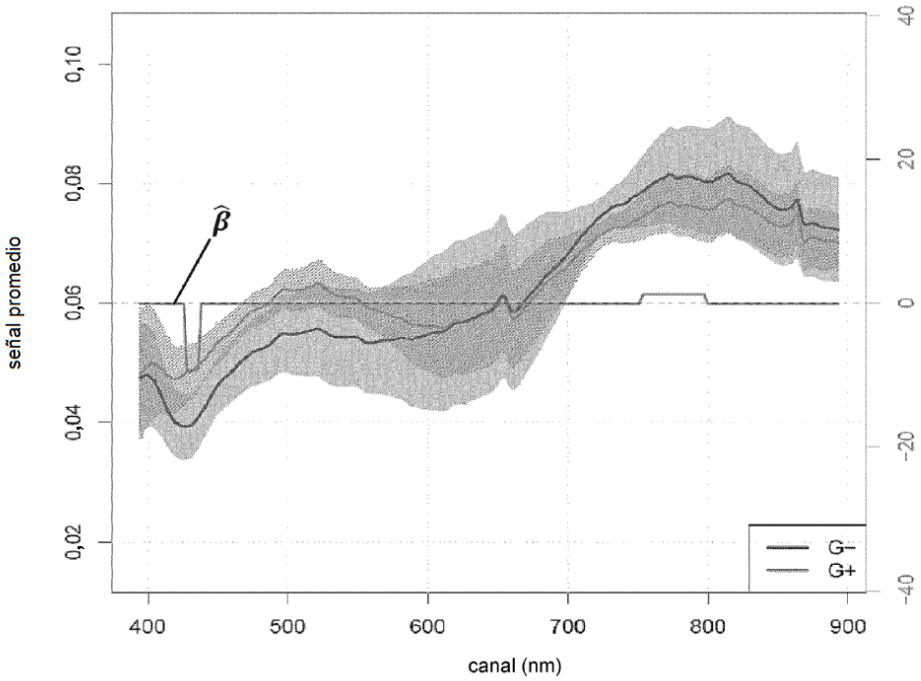

Figura 12

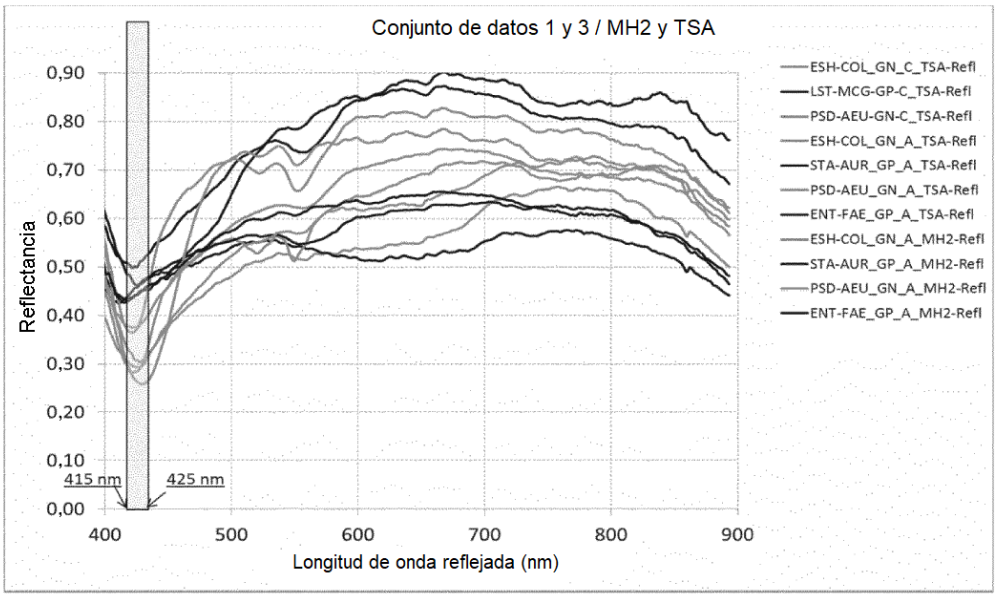

Figura 13A

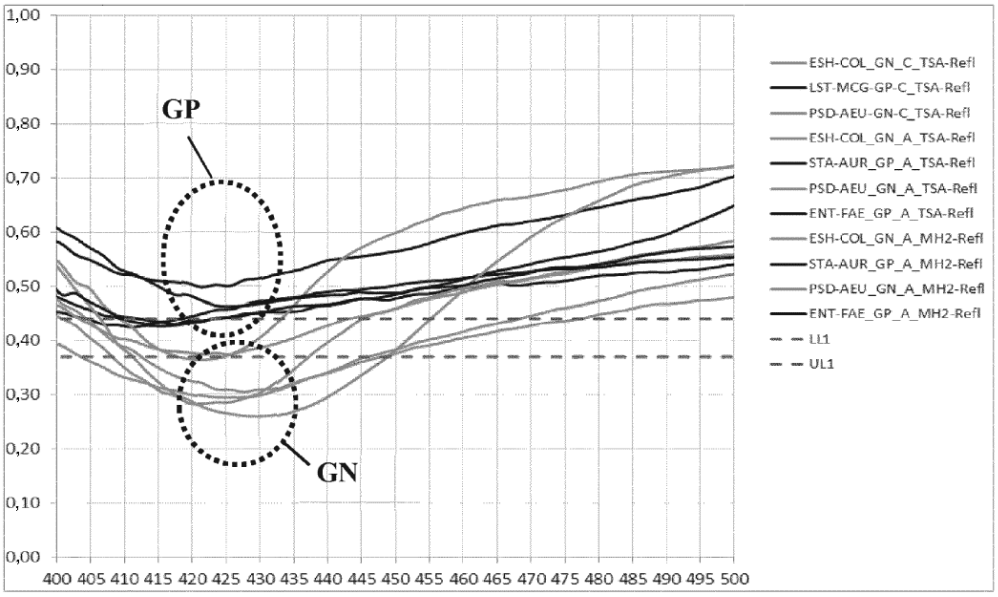

Figura 13B