

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 507**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/AU2012/000210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12755407 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2681303**

54 Título: **Aparato de iluminación y captura de imágenes**

30 Prioridad:

**04.03.2011 AU 2011900784**

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

**02.03.2020**

73 Titular/es:

**LBT INNOVATIONS LIMITED (100.0%)  
300 Flinders Street  
Adelaide, South Australia 5000, AU**

72 Inventor/es:

**GUTHRIE, LUSIA, HALINA;  
GLASSON, JOHN, HUGHES;  
BULLOCK, GRAEME, JOHN;  
CROSS, GRAEME y  
HILL, RHYS, ERNST**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 745 507 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

Aparato de iluminación y captura de imágenes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a aparato de iluminación y captura de imágenes, para usar en el análisis del crecimiento microbiano en un medio de cultivo sólido, particularmente, el crecimiento microbiano en forma de colonias bacterianas aisladas, que se desarrollan después de la inoculación e incubación del medio de cultivo sólido con una muestra microbiológica. Se contempla que el aparato de iluminación y captura de imágenes de la presente invención encuentre utilidad en un laboratorio microbiológico.

**Antecedentes de la invención**

10 El aislamiento de colonias individuales de microorganismos (y en particular, de bacterias) es un procedimiento importante en muchos laboratorios microbiológicos. Normalmente este aislamiento de bacterias lo realiza un técnico de laboratorio experto, ya sea en forma manual o automática, mediante un equipo de estriado [*streaking*] robotizado. En cualquier caso, primero se coloca una muestra microbiológica sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, seguido de la diseminación de la muestra microbiológica por toda de la superficie del medio (lo que se denomina "estriado"). Por lo general, se hacen múltiples estrias de dilución creciente del inóculo por todo el medio de cultivo sólido.

15 Las estrias de dilución creciente tienden a proporcionar —en general, hacia la cola de las estrias— un número de células individuales que permiten el crecimiento de colonias microbiológicas aisladas después de la incubación. Estas colonias aisladas pueden ser analizadas para detectar diversas características físicas, como por ejemplo, la morfología de la colonia, y pueden ser susceptibles de tinción y de otros procedimientos que quizá sean necesarios para determinar, por ejemplo, el género, la especie y/o la cepa del organismo previamente no identificado en la muestra microbiológica.

20 Tradicionalmente, este análisis solía llevarse a cabo en un laboratorio microbiológico, en forma visual, una tarea a cargo de tecnólogos expertos, cuya finalidad consistía en que el tecnólogo realizara una evaluación microbiológica. Esta evaluación podía incluir la detección de la presencia o ausencia de colonias bacterianas, la detección de uno o más colores de cada tipo de colonia, el mapeo de la distribución de colores para determinar la presencia de variaciones en el color, que pudieran atribuirse a la fermentación o la hemólisis, la diferenciación entre crecimiento de colonias confluentes y aisladas, la medición de la textura o la viscosidad de colonias y la determinación de formas bidimensionales y tridimensionales, y/o la enumeración de los diferentes tipos de colonias.

25 Cuando se identifica el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, el medio de cultivo sólido avanza al siguiente paso del flujo de trabajo del laboratorio y se convierte en tema de identificación confirmatoria adicional y pruebas de sensibilidad a los antibióticos, de acuerdo con los requisitos reglamentarios actuales.

30 A lo largo de los años, se han realizado algunas iniciativas, por ejemplo, para capturar imágenes (ya sea fijas o de video, y en formas analógicas o digitales) de colonias bacterianas, para que el tecnólogo pudiera ver de manera más eficiente un mayor número de superficies, utilizando elementos visuales auxiliares, tales como monitores, microscopios, contadores de colonias y/o computadoras.

35 Es importante capturar estas imágenes con precisión, ya que el color, la forma y la textura de las colonias bacterianas y el color del medio de cultivo sólido se utilizan para identificar, por ejemplo, el tipo de bacteria. Muchos medios de cultivo sólidos comerciales, como los agares, son inicialmente de varios colores y transparencias y algunos son casi opacos en su totalidad (por ejemplo, los agares de identificación del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). Algunas placas se dividen en dos mitades, de modo que cada lado de la placa tenga un tipo diferente (y potencialmente, un color distinto) de agar. Además, las colonias bacterianas pueden ser de diferentes colores, formas y texturas. Algunas son puntos redondos simples; otras pululan en ondas continuas a través de la superficie del agar, y algunas tienen una topografía superficial característica, como hoyuelos o una textura granular. El efecto de las colonias bacterianas en los indicadores de color mezclados en la formulación de agar puede producir, por ejemplo, una reacción de color fuerte, como el halo azul alrededor de las colonias de MRSA en el agar indicador específico o en la reacción de color resultante de los cambios de pH causados por crecimientos bacterianos en el agar que contiene los compuestos indicadores apropiados, como rojo neutro. En otro ejemplo, se pueden ver más cambios de color en los agares de la sangre, inmediatamente debajo y alrededor de las colonias que pueden dañar o destruir los glóbulos rojos mediante la hemólisis.

40 El documento de patente con el número CN201007773 describe un aparato para su uso en el análisis del crecimiento microbiano, en un dispositivo de cultivo celular que proporciona un sistema de imágenes de fondo oscuro de la zona de inhibición, en el que las paredes internas y la placa inferior están todas pintadas de negro, evitando la reflexión óptica. Constituye un objetivo de la presente invención proporcionar un aparato para capturar imágenes suficientemente precisas de crecimiento microbiano, con el fin de facilitar la realización de la evaluación microbiológica.

55

Antes de pasar al compendio de la presente invención, debe apreciarse que la descripción anterior del estado de la técnica se ha proporcionado simplemente como antecedentes para explicar el contexto de la invención. No debe interpretarse como una admisión de que alguno de los materiales mencionados fue publicado o conocido o parte del conocimiento general común en Australia o en otros lugares.

**5 Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un aparato para usar en el análisis del crecimiento microbiano en un medio de cultivo sólido en una placa de cultivo; el aparato según la reivindicación 1 independiente incluye lo siguiente:

un dispositivo de captura de imágenes,

10 un soporte para sostener la placa de cultivo, a fin de que el dispositivo de captura de imágenes tome una imagen del medio de cultivo sólido y de cualquier crecimiento microbiano,

una luz anular entre el dispositivo de captura de imágenes y el soporte, para iluminar difusamente un lado de la placa de cultivo, y

un marco, para posicionar el dispositivo de captura de imágenes, el soporte y la luz anular uno con respecto al otro.

15 Los expertos en la materia apreciarán que con respecto a la frase “en un medio de cultivo sólido”, la palabra “en” se usa para referirse al crecimiento microbiano tanto en la superficie del medio de cultivo sólido como dentro del medio de cultivo sólido. La expresión “medio de cultivo sólido” a menudo se denominará en lo sucesivo simplemente “medio” en la memoria descriptiva. Por ejemplo, se apreciará que de aquí en adelante, una muestra microbiológica denominada simplemente “muestra”, puede dispensarse sobre la superficie del medio o dentro del medio, para que pueda desarrollarse el crecimiento microbiano después de la inoculación y la incubación del medio con la muestra. Es decir, el crecimiento microbiano en el medio resulta de la inoculación e incubación de la muestra, como una muestra de orina, una muestra entérica, una muestra de sangre, una muestra de linfa, una muestra de tejido, una muestra de agua, una muestra de alimentos u otra muestra relevante, en el medio.

20 Además, los expertos en la materia también apreciarán que el medio será generalmente, por ejemplo, agar y que estará contenido en un recipiente, como una placa, y, en un ejemplo más específico, una placa de Petri, que puede tener una tapa. La combinación del medio y de la placa se denomina en lo sucesivo en toda la memoria descriptiva como “placa de cultivo”, que a veces se podría denominar en la técnica como una “placa de agar”.

30 Se ha encontrado que el aparato, en un ejemplo ilustrativo, ofrece imágenes lo suficientemente precisas del crecimiento microbiano en el medio, como para proporcionar una evaluación microbiológica. Un técnico de laboratorio calificado puede realizar esta evaluación en forma manual. Alternativamente, la evaluación puede automatizarse y llevarse a cabo usando un clasificador que ha sido entrenado usando un algoritmo de aprendizaje automático. Las imágenes obtenidas usando el aparato pueden procesarse y emplearse como datos de entrada en el clasificador. Un ejemplo de dicho clasificador se describe en la solicitud internacional en trámite del mismo solicitante, y con la misma fecha de presentación, titulada “Método y *software* para analizar el crecimiento microbiano”, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia.

35 El dispositivo de captura de imágenes puede ser una cámara digital y una lente. Por ejemplo, se ha encontrado que una cámara digital en color de alta resolución, en combinación con una lente apropiada proporciona imágenes de calidad de las placas. Los dispositivos de captura de imágenes que tienen muchas especificaciones diferentes son adecuados para el propósito que entendería el destinatario experto.

40 El crecimiento microbiano puede incluir, por ejemplo, uno o más crecimientos bacterianos, hongos, placas virales o crecimientos protistas, y el crecimiento puede adoptar la forma de una colonia, micelio, hifa, placa u otra estructura microbiana visible. En algunas realizaciones, cada crecimiento microbiano puede ser un crecimiento que se origina a partir de un único microbio (por ejemplo, cuando se aplica una muestra a un medio de forma diluida, de modo que los microbios individuales se separan).

45 El medio puede incluir cualquier medio que promueva el crecimiento de un microbio. En tal sentido, un medio puede contener uno o más nutrientes microbianos que incluyan, por ejemplo, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, elementos esenciales y/o vitaminas esenciales. El medio también contendrá típicamente un agente gelificante que incluye, por ejemplo, gelatina, agar, goma gellan, agarosa o gel de agar.

50 En algunas realizaciones, la muestra para análisis está dispuesta en más de una placa de cultivo o en una placa de cultivo dividida, que tenga más de un segmento. En estas realizaciones, el análisis del crecimiento microbiano se realiza tomando imágenes a través de las diferentes placas de cultivo o segmentos, y los resultados de las clasificaciones de píxeles se analizan como se indicó anteriormente para que se pueda realizar una evaluación microbiológica basada en una comparación de crecimiento microbiano en las diferentes placas o segmentos de cultivo.

En algunas realizaciones, el medio puede incluir un medio de cultivo selectivo, que generalmente se lo conoce en la técnica por incluir medios con composiciones de nutrientes restringidas, medios que contienen un antibiótico, o similares, que permiten el crecimiento de algunos microorganismos, en tanto que impiden el crecimiento de otros microorganismos.

5 El uso de un luz anular para iluminar difusamente un lado de la placa de cultivo ayuda a un clasificador a distinguir entre la luz reflejada desde el medio (que puede clasificarse como fondo) y el crecimiento microbiano. La referencia a un “lado” de la placa de cultivo debe interpretarse como que se refiere a cualquiera de sus lados, incluso el lado frontal, posterior, izquierdo, derecho, superior o inferior de la placa de cultivo. En una realización preferida, la luz anular ilumina difusamente la parte superior de la placa de cultivo, por ejemplo, la superficie del medio en el que está presente el  
10 crecimiento microbiano.

El medio tiene un menisco alrededor de su periferia exterior donde entra en contacto con las paredes de la placa de cultivo. Como la superficie del medio puede ser brillante, este menisco puede generar una reflexión especular en una imagen tomada por el dispositivo de captura de imágenes. Si se utilizaron luces puntuales para iluminar la placa de cultivo, el clasificador puede interpretar estas reflexiones como colonias bacterianas. Al usar una luz anular con  
15 iluminación difusa, la fuente de luz aparece en la imagen como una línea continua y lisa. Por lo tanto, cualquier reflejo proveniente del menisco se ve como una línea lisa y continua que el clasificador puede distinguir de las colonias bacterianas reales.

La luz anular puede incluir una pluralidad de LED [*light emitting diode*, diodo emisor de luz] ordenados en una disposición circular y un difusor asociado con los LED. De un modo alternativo, los LED en sí pueden producir luz  
20 difusa, y puede no requerirse un difusor separado. Los LED pueden estar espaciados uniformemente alrededor de la disposición, en un solo anillo o en múltiples anillos. En una disposición, los LED pueden ser iluminados selectivamente de modo que, por ejemplo, solo la mitad o una fracción más pequeña de la luz anular se active al mismo tiempo. Esto puede proporcionar una iluminación en ángulo de la placa de cultivo y puede ser útil para resaltar la topografía de la superficie del medio. Para garantizar una distribución uniforme de la intensidad de la luz, el número de LED en la  
25 disposición puede ser mayor que 50, con preferencia mayor que 180, de modo que haya un LED separado cada 2 grados. Además, el difusor es un auxiliar que ayuda a suavizar la distribución de la luz. En otras alternativas, la luz anular puede ser una luz fluorescente o una pluralidad de fuentes de fibra óptica con un difusor.

La luz anular puede ubicarse con relación al soporte de modo que el reflejo especular de la luz proveniente de la luz anular, desde una superficie central del medio, esté en un ángulo que no sea captado por el dispositivo de captura de  
30 imágenes. Por ejemplo, la luz anular puede tener un ancho o diámetro de entre 120 y 250 mm y puede colocarse entre 30 y 50 mm por encima del soporte. Como una placa de cultivo suele ser circular, que generalmente tiene un diámetro de entre 80 y 110 mm, la luz emitida por los LED impacta en la superficie central de la placa de cultivo, en un ángulo tan bajo que no se refleja en la lente de la cámara. Esto evita que aparezcan reflejos de los LED en la imagen, con lo que se obtiene una imagen de mayor calidad, para lograr datos de entrada más precisos al clasificador y, por lo tanto,  
35 también una evaluación más exacta.

Además de la luz anular, el aparato puede incluir, asimismo, un dispositivo de iluminación para iluminar otro lado de la placa de cultivo. Por ejemplo, si la luz anular iluminó la parte superior de la placa de cultivo, el dispositivo de  
40 iluminación puede iluminar el lado inferior o la base de la placa de cultivo. En una disposición, el dispositivo de iluminación puede ser una luz lateral de ángulo bajo. En otra disposición, el dispositivo de iluminación puede ser una luz de panel plano para iluminar la base de la placa de cultivo. El dispositivo de iluminación puede incluir una pluralidad de LED y un difusor asociado con la pluralidad de LED. Los LED pueden estar dispuestos en forma cuadrada o rectangular para crear la luz del panel plano.

El uso de iluminación desde diferentes lados de la placa de cultivo permite que el dispositivo de captura de imágenes capte diferentes características clínicamente relevantes de las colonias que están en las placas de cultivo. Se puede  
45 capturar una secuencia de imágenes bajo varias configuraciones de iluminación. Estas configuraciones de iluminación incluyen luz superior, para visualizar el color de la colonia; luz inferior, para visualizar los cambios de color en el volumen del medio (por ejemplo, agar), debajo y alrededor de la colonia, y luz lateral de ángulo bajo, para visualizar cualquier topografía de la superficie, como hoyuelos o granularidad. Para capturar las imágenes, no es necesario mover los fondos físicos: las luces se pueden iluminar por separado mediante interruptores eléctricos. Sin embargo,  
50 se apreciará que no es necesario usar todas las configuraciones de iluminación para obtener una evaluación microbiológica significativa.

Cuando se utiliza una luz inferior (por ejemplo, la luz del panel plano), la captura de imágenes se puede facilitar utilizando un soporte transparente. Por “transparente” se entiende que la luz del dispositivo de iluminación puede pasar  
55 a través del soporte y ser captada por el dispositivo de captura de imágenes. En una realización, el soporte puede ser una plataforma de vidrio. Otras formas de soporte, como una estructura de alambre o “dedos” cortos alrededor del borde de la placa de cultivo también podrían lograr el mismo efecto.

En el mejor de los casos, el soporte coloca la placa de cultivo inmediatamente debajo del dispositivo de captura de imágenes con su campo de visión dirigido a la placa de cultivo. Además de capturar la placa de cultivo en una imagen, el dispositivo de captura de imágenes también puede capturar el área que rodea a la placa de cultivo. El aparato puede

estar dispuesto para incluir en el área que rodea a la placa de cultivo, en el campo de visión de la cámara, varias funcionalidades de prueba óptica, tales como un objetivo de enfoque, parches de corrección de color o guías de alineación.

5 Un operador puede posicionar manualmente una placa de cultivo en el soporte para captar imágenes de ella, y el soporte puede incluir uno o más elementos de posicionamiento transparentes, que faciliten la ubicación de la placa de cultivo. Estos elementos pueden definir una posición en el soporte de manera que la placa de cultivo se ubique con precisión en el campo de visión de la cámara. El uso de elementos transparentes mantiene la uniformidad de iluminación en la proximidad de los elementos. Los elementos de posicionamiento transparentes pueden adoptar una forma triangular, con el vértice del triángulo apuntando hacia el centro del soporte. Por lo tanto, la placa de cultivo  
10 puede colocarse de manera que el vértice de los triángulos toque la circunferencia de la placa de cultivo. Se descubrió que los elementos triangulares transparentes producen una perturbación mínima en la iluminación uniforme. Los elementos transparentes pueden tener de un modo alternativo una forma diferente o pueden ser postes que sobresalgan de la superficie del soporte.

15 Otros dispositivos para la colocación manual incluyen una entalladura circular en el que cae la placa de cultivo o una serie de finos dedos de alambre que tocan la pared externa de la placa de cultivo. En otra forma de realización, la placa de cultivo cuyas imágenes van a tomarse se puede ubicar de manera automática, mediante un dispositivo robotizado de posicionamiento. En este caso, el dispositivo robotizado puede programarse para colocar la placa de cultivo en una posición predeterminada, y no se requerirían paradas físicas.

20 El marco puede ser una estructura rígida que ubica al dispositivo de captura de imágenes, al soporte y a la luz anular uno con respecto al otro. El marco puede construirse en múltiples partes que están conectadas entre sí mediante pernos, tornillos o cualquier medio de conexión adecuado. De un modo alternativo, el marco puede formarse en una sola pieza, mediante el uso de técnicas o moldes adecuados para trabajar el metal. El marco puede desempeñar un papel en la prueba de luz del aparato, como se describirá a continuación.

25 El marco puede incluir una cubierta opaca para sostener el soporte. Por "opaco" se entiende que la luz que puede pasar a través de la cubierta es escasa o nula. Por ejemplo, la cubierta puede ser una pieza plana de aluminio u otro metal que se extienda a lo ancho del marco. La cubierta opaca puede incluir un orificio sobre el que se asienta la plataforma de vidrio para que una luz inferior todavía pueda iluminar el lado inferior de la placa de cultivo, a través de la cubierta opaca. El orificio en la cubierta a prueba de luz puede tener, además, un ancho que sea menor que el ancho de la luz anular, para que la luz proveniente de la luz anular no se refleje en la base del marco y suba por rebote  
30 a través de la placa de cultivo. De esta manera, cuando la luz anular está iluminada, no hay luz discernible que ingrese a través del medio, al dispersarse desde cualquier superficie que rodee a la placa de cultivo o que esté debajo de ella, o de cualquier luz dispersada y transmitida por el medio (por ejemplo, agar translúcido) en sí mismo. El orificio puede tener una forma que coincida con la forma de la luz anular, por ejemplo, circular, pero las formas no necesariamente deben coincidir. Para capturar una imagen de toda la placa de cultivo, el orificio debe superar en tamaño a la placa de cultivo más grande cuyas imágenes deben ser captadas.  
35

40 En una realización, el marco define una cavidad tal que el soporte sostenga la placa de cultivo entre el dispositivo de captura de imágenes y la cavidad. El efecto de la cavidad es proporcionar un "fondo negro" para capturar imágenes de alto contraste de la placa de cultivo translúcida iluminada por la luz anular. Cuando la luz anular está iluminada y cualquier otro dispositivo de iluminación está apagado, el marco alrededor de la placa de cultivo (por ejemplo, la cubierta opaca) evita que la luz proveniente de la luz anular caiga en la base de la cavidad. Esto se logra seleccionando la altura de la cavidad para que las sombras del marco cubran la base de la cavidad y la luz proveniente de la luz anular impacte en los bordes de la cavidad y sea absorbida por ellos.

45 El marco puede incluir, además, deflectores de luz que forman una pared de la cavidad. Estos deflectores pueden rodear completamente la cavidad debajo de la placa de cultivo, y sus superficies internas pueden ser negras, ya sea porque se las pinta de ese color o porque se las cubre con un material absorbente de luz texturizado, como terciopelo negro o un material de espuma negra porosa de celdas abiertas.

50 La cavidad o el vacío se ve como un fondo negro y tiene la ventaja de que puede iluminarse sin mover físicamente ningún componente del aparato. La cavidad puede sellarse, por ejemplo, mediante el marco y el soporte, para evitar que el material caiga en ella. Por ejemplo, cuando el soporte es una plataforma de vidrio, esto puede extender todo el ancho del marco para permitir una limpieza fácil y evitar la contaminación.

55 El marco puede servir para el propósito adicional de formar un recinto opaco (a prueba de luz) alrededor del aparato. El marco puede estar hecho, por ejemplo, de barras de metal o de una lámina de metal. Las superficies internas del marco pueden oscurecerse para reducir el reflejo de cualquier luz parásita proveniente de las superficies. El marco puede incluir una puerta de acceso para colocar la placa de cultivo en el soporte. La puerta puede tener bisagras y sellos flexibles, a prueba de luz, de modo que, cuando está cerrada, no permita que ingrese al recinto una cantidad significativa de luz.

Aunque las referencias espaciales de los componentes del aparato descritos anteriormente se basan en una placa de cultivo que se asienta en el aparato en una orientación vertical, con la superficie del medio generalmente plana y horizontal, se apreciará que los componentes del aparato pueden disponerse en otras orientaciones. Las referencias a “por encima”, “por debajo”, “arriba” o “abajo” no deben tomarse como limitativas del posicionamiento de los componentes, sino que se proporcionan simplemente para facilitar la explicación. Por ejemplo, la placa de cultivo puede asentarse en el aparato de modo que la superficie del medio sea vertical, mirando hacia abajo, o en cualquier otra orientación. En estos casos, los componentes del aparato estarían dispuestos de manera correspondiente para proporcionar una iluminación y una captura de imágenes apropiadas de la placa de cultivo.

En otra realización más, el aparato puede incluir además medios para cambiar la posición de la luz anular con respecto al soporte. Por lo tanto, la luz anular puede levantarse o bajarse para permitir la entrada de grandes mecanismos robotizados o para proporcionar diferentes ángulos de iluminación para diferentes tipos de placas. Los medios para cambiar la posición de la luz anular también permiten obtener datos de imágenes adicionales para una placa de cultivo tomando imágenes con la luz anular a diferentes alturas. Los mecanismos para subir y bajar la luz anular pueden incluir un dispositivo motorizado de cremallera y piñón entre el soporte de la luz derecho y el marco, o un conjunto de cables de suspensión equidistantes, conectados al soporte de la luz anular, que se enrollan o desenrollan a través de un motor eléctrico.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán las realizaciones de la presente invención, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Debe entenderse que la particularidad de los dibujos no reemplaza la generalidad de la descripción anterior de la invención.

La figura 1 es un diagrama esquemático de un aparato para usar en el análisis del crecimiento microbiano en un medio de cultivo sólido, en una placa de cultivo.

La figura 2(a) es una captura de pantalla de una GUI [*graphical user interface*, interfaz gráfica del usuario] para que un usuario capture las imágenes. Las figuras 2(b) a 2(e) son vistas en primer plano de los detalles del lado izquierdo de la captura de pantalla de la figura 2(a).

La figura 3 es una serie de capturas de pantalla que muestran una GUI para ingresar la posición de una placa de cultivo en una imagen.

La figura 4 es un diagrama de flujo que muestra un método para capturar una imagen de crecimiento microbiano en un medio de cultivo sólido.

### Descripción detallada de una realización

La figura 1 muestra una realización de un aparato 100 para usar en el análisis del crecimiento microbiano en un medio en una placa de cultivo 102, en forma de una placa de agar. El aparato 100 incluye los siguientes componentes:

- Un dispositivo de captura de imágenes 104 en forma de una cámara digital 106 de alta resolución, de calidad de visión artificial con una lente de distancia focal fija apropiada, 108. La cámara 106 se coloca a unos 200 mm por encima de una luz anular 110.

- La luz anular 110 tiene un diámetro grande en relación con el diámetro de la placa de cultivo 102. En este ejemplo, la luz anular tiene un diámetro de 180 mm. La luz anular 110 contiene varios cientos de LED blancos ordenados en una disposición circular y un difusor. Esta luz proporciona iluminación lateral difusa de ángulo bajo para permitir que la placa de cultivo se ilumine uniformemente. La luz anular 110 se coloca alrededor de 40 mm por encima de una cubierta opaca 112 que forma parte del marco 118 y, por lo tanto, unos 30 mm por encima de la placa de cultivo 102. El posicionamiento de la luz anular 110 para que la luz de los LED blancos incida en la superficie de la placa de cultivo 102 en un ángulo bajo evita una reflexión especular de los LED desde una superficie central del medio que se está captando por el dispositivo de captura de imágenes 104.

- Un dispositivo de iluminación 114 en forma de una luz de panel plano, basado en una serie de LED blancos detrás de un difusor. El dispositivo de iluminación 114 se encuentra a unos 150 mm por debajo de la cubierta opaca 112. Esta distancia se elige de modo que la luz proveniente de la luz anular 110 caiga sobre los deflectores en lugar de la luz 114, para reducir la iluminación trasera de la placa de cultivo 102.

- Un soporte 116 para sostener la placa de cultivo 102 en el campo de visión directo del dispositivo de captura de imágenes 104. El soporte 116 es una plataforma de vidrio transparente, que tiene un grosor de 3 mm. El vidrio puede reemplazarse si se raya con el tiempo. El soporte 116 incluye dos o más elementos de posicionamiento transparentes en forma de triángulo, para colocar la placa de cultivo 102 en el soporte. Los vértices de los triángulos apuntan hacia el centro del soporte para la colocación de la placa de cultivo 102, de modo que los vértices toquen la circunferencia de la placa de cultivo 102.

- 5 • Un marco 118 posiciona el dispositivo de captura de imágenes 104, el soporte 116, la luz anular 110 y el dispositivo de iluminación 114 unos respecto de otros. El marco 118 está hecho de un material opaco, como una lámina de metal o plástico, que reduce la cantidad de luz que ingresa al aparato 100. Las superficies internas del aparato 100 se oscurecen cuando sea posible para reducir la reflexión de la luz proveniente de las superficies internas hacia la lente 108.
- 10 • El marco 118 incluye una puerta 120 que proporciona un parche de acceso para que un operador humano coloque la placa de cultivo 102 en el soporte 116. De un modo alternativo, un dispositivo robotizado para la manipulación de las placas puede usar la vía de acceso para colocar la placa de cultivo 102 precisamente en el soporte 116, a fin de captar las imágenes, y luego para trasladar la placa de cultivo a un canal/ portaobjeto designado. Por ejemplo, la placa de cultivo puede colocarse en un canal de salida que represente una de las hasta cuatro categorías descritas anteriormente.
- 15 • La cubierta opaca 112 es una placa de aluminio que se extiende a lo ancho del marco 118 y que divide efectivamente el marco 118 en un recinto superior 122 y un recinto inferior 124. La cubierta opaca 112 incluye un orificio 126, para permitir que la luz proveniente del dispositivo de iluminación 114 se transmita hasta llegar a la placa de cultivo 102. El ancho del orificio 126 es un poco más grande que el ancho de la placa de cultivo 102 (que es de 90 mm en este ejemplo y que es típicamente de entre 88 y 100 mm) y es menor que el diámetro de la luz anular 110. Esto evita que la luz emitida por la luz anular 110 se refleje desde la superficie inferior 128 del marco 118 o la superficie de la luz del panel plano 114 y de vuelta a través de la placa de cultivo 102.
- 20 • El marco 118 también incluye los deflectores de luz 130 colocados debajo de la cubierta opaca 112.
- 25 • Los medios 131 para cambiar la posición de la luz anular 110 con respecto al soporte 116 también se proporcionan en forma de un montaje de piñón y cremallera.
- 30 • El marco 118, la cubierta opaca 112 y los deflectores de luz 130 definen una cavidad 132, de manera que el soporte 116 sostenga la placa de cultivo 102 entre el dispositivo de captura de imágenes 104 y la cavidad 132. El soporte (plataforma de vidrio) 116 sella la cavidad 132 y evita que el material no deseado caiga en la cavidad 132. Cuando la luz anular 110 se ilumina y el dispositivo de iluminación 114 está apagado, la cubierta opaca 112 evita que la luz proveniente de la luz anular 110 ilumine áreas visibles de la cavidad 132. En esta configuración, la cavidad 132 parece un fondo negro.
- 35 • Se usa una luz de ángulo lateral 134 para iluminar la placa de cultivo 102 desde un ángulo, a fin de destacar cualquier topografía de la superficie en el agar, tal como hoyuelos o una textura granular. Una alternativa a la luz de ángulo lateral 134 es activar solo algunos de los LED en la luz anular 110, de modo que la placa de cultivo 102 se ilumine desde una sola dirección.
- 40 • Un medio de procesamiento, tal como una computadora 136, está conectado al dispositivo de captura de imágenes 104, a la luz anular 110 y al dispositivo de iluminación 114, a través de una interfaz física o inalámbrica. La computadora 136 puede incluir un procesador 138 y una memoria 140, que almacena el *software* 142 para activar los diferentes componentes, capturar datos sin procesar y procesar los datos.
- 45 • Una biblioteca de imágenes, metadatos y otra información puede almacenarse en la computadora 136, o puede ser accesible en la computadora 136 a través de una red. Del mismo modo, se puede acceder al LIMS [*Library Information Management System*, sistema de manejo de la información de la biblioteca] a través de la computadora 136.
- 50 Se apreciará que los diferentes componentes pueden ser sustituidos por cualquiera de los componentes del dispositivo descritos anteriormente, y que tanto la distancia entre los componentes como su posición se pueden regular. Por ejemplo, aunque la cámara 106 y la lente 108 se muestran dentro del marco 118, en otro ejemplo podrían colocarse fuera del marco 118, con la lente 108 sobresaliendo a través de un orificio en la superficie superior del marco 118. Además, el ancho del marco 118 podría reducirse para achicar el tamaño total del aparato 100.
- 55 A continuación se describirá un proceso de adquisición de imágenes, utilizando el aparato 100. Este proceso puede ser adecuado para obtener imágenes para su uso en la clasificación del crecimiento microbiano en la placa de cultivo 102, usando un clasificador de aprendizaje mecánico entrenado, o en el entrenamiento de dicho clasificador. Se describirá un proceso manual, donde muchos pasos son realizados por un operador humano, aunque se apreciará que muchos de ellos pueden ser automatizados y realizados con el *software* o mediante un dispositivo robotizado.
- En primer lugar, un usuario coloca una placa de cultivo 102 inoculada e incubada en el soporte 116, dentro de los topes triangulares. Las placas de cultivo 102 se almacenan generalmente dentro de un laboratorio, con el agar mirando hacia abajo (para evitar que la condensación formada en la tapa caiga sobre la superficie del agar y la dañe), por lo que colocar la placa de cultivo 102 en el soporte puede incluir quitar una tapa de la placa de cultivo 102 y rotar la placa de cultivo para que el agar quede mirando hacia arriba.
- El *software* 142 se activa para comenzar el proceso de captura de imágenes. El *software* 142 requiere que el usuario escanee un código de barras en la placa de cultivo 102, o ingrese un número manualmente. El código de barras se vincula a una ID de la muestra, que vincula la placa de cultivo con una muestra particular y, a través de un sistema

LIM, con un paciente en particular. Una vez que se ha ingresado el código de barras, aparece una vista previa de video en vivo de la salida de la cámara en la ventana que se muestra en la figura 2(a). El usuario puede ajustar la ubicación de la placa de cultivo 102 o el foco o la abertura de la lente 108, en función de la retroalimentación proporcionada por la transmisión de video en vivo.

- 5 Luego, el usuario debe seleccionar el tipo de placa de cultivo (por ejemplo, dividida o entera), el tipo de muestra (por ejemplo, de orina, entérico, de sangre o de tejido) y el o los tipos de agar (por ejemplo, sangre o cromogénico). Un ejemplo de opciones de selección de datos de placa se muestra en la figura 2(b) y en la parte superior izquierda de la figura 2(a). Como alternativa, en lugar de requerir que el usuario seleccione la placa de cultivo, la muestra y el tipo de agar, esta información podría extraerse del sistema LIM, en función del código de barras ingresado.
- 10 Después de ingresar estos datos, se ingresa la posición de la placa de cultivo. Hay dos métodos con los que el usuario puede ingresar esta información. El primero es a través de un conjunto tradicional de barras de desplazamiento [*slider*], que permiten la entrada de la ubicación x, y de la cubeta de cultivo, junto con su radio. Si la cubeta de cultivo es una cubeta de cultivo dividida, el usuario también debe ingresar la ubicación de la división. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 2(c) y en la parte inferior izquierda de la figura 2(a). El segundo método consiste en la manipulación de un conjunto de marcadores sobre la vista previa del video en vivo. El usuario coloca el círculo alrededor del agar, a través de tres puntos, que el usuario puede mover interactivamente. Estos tres puntos definen de manera única un círculo. Un cuarto punto de control permite al usuario especificar la ubicación de la división central, si corresponde. Dichos puntos de control son rápidos y fáciles de colocar con mucha precisión. La figura 3 muestra un ejemplo de cómo podría ocurrir tal interacción. En un sistema con una ubicación de placa de cultivo robotizada, se conocerá la ubicación de la placa de cultivo y se podrá calcular la ubicación de la división.
- 15
- 20

Las configuraciones referidas a la exposición y a luz pueden extraerse de una base de datos, en función de la placa de cultivo, de la muestra y de los tipos de agar seleccionados.

- 25 La exposición correcta es importante para una captura de imágenes de buena calidad. Durante la prueba de la cámara 106, se determinó que se requieren exposiciones separadas para cada lado de una placa de cultivo dividida, debido a las diferentes opacidades de los diferentes tipos de agares que pueden contener. La elección de la iluminación también influirá en gran medida en la configuración de exposición requerida, por lo que el usuario también puede ver la imagen en cualquier configuración disponible, con las luces superior o inferior activadas. La figura 2(d) muestra botones de radio que pueden usarse para seleccionar si debe activarse la luz superior o la luz inferior. Aunque no se muestra, el usuario puede elegir de un modo alternativo la luz de ángulo lateral para activar.

- 30 El usuario puede ajustar las configuraciones de exposición, por ejemplo, usando diversos algoritmos de exposición automática que pueden seleccionarse usando un menú desplegable, como se muestra en la figura 3(e). Cada uno de los algoritmos de exposición automática tiene el mismo núcleo. Dado un brillo objetivo [*target brightness*],  $b_{tgt}$ , y un brillo medido,  $b_{meas}$  [*measured brightness*], la nueva exposición,  $e_{new}$ , se calcula como:

$$\alpha = \frac{b_{tgt}}{b_{meas}}$$

$$e_{new} = \begin{cases} 0.8 e_{old} & \text{si } b_{meas} > 1 \\ 0.5 e_{old} & \text{si } \alpha < 0.5 \\ 2 e_{old} & \text{si } \alpha > 2 \\ \alpha e_{old} & \text{de otro modo} \end{cases}$$

- 35 En otras palabras, si el brillo es demasiado alto (la imagen está saturada), reduzca incondicionalmente la exposición al 80 % de su valor anterior. Si este no es el caso, el cambio se restringe a un valor de entre 0,5 y 2. El ajuste se detiene si dos configuraciones de exposición sucesivas están dentro de 10 microsegundos entre sí. Ambas medidas de brillo generalmente se representan como un número variable entre cero y uno, donde cero es negro (sin brillo) y uno es blanco (brillo total).

- 40 La diferencia entre los diversos algoritmos de exposición automática está en cómo calculan el brillo de la imagen actual. Los diferentes algoritmos que pueden usarse incluyen los siguientes:

Media: en este modo, se calcula el brillo medio de todos los píxeles de la imagen.

Media ponderada al centro: la media ponderada al centro calcula la media del brillo de todos los píxeles, pero da los píxeles dentro de  $\sqrt{8} \times r$  del peso adicional del centro (cada muestra central se cuenta 8 veces)



Puntual: este método nuevamente calcula una media del brillo, pero solo de los píxeles que están dentro de  $\sqrt{20\%}$  del centro. Este método no es tan apropiado para las placas de agar, ya que el centro de la imagen no tiene un significado especial.

5 Mediana: este método calcula la mediana del brillo de la imagen, mediante un cálculo de histograma. Cada bin del histograma tiene 4 niveles de ancho; por lo tanto, si las imágenes de entrada son de 16 bits, el histograma tiene 16.384 bins. La verdadera profundidad en bits de las imágenes también podría leerse desde la cámara y proporcionarse al algoritmo.

10 Verde: este método es el mismo que el de la media, pero usa solo el canal verde para calcular el brillo. Esto es ventajoso por dos razones. Primero, hay dos veces más píxeles verdes verdaderos en una imagen con mosaico de Bayer que rojos o azules. En segundo lugar, el ojo humano es sensible al verde, por lo que usarlo para ajustar las imágenes debería proporcionar una imagen conceptual de alta calidad.

El *software* 142 puede incluir, además, procesos para ayudar al usuario a seleccionar una buena configuración de exposición, por ejemplo, pulsando píxeles entre su color normal y rojo. Esto ayuda a identificar píxeles sobreexpuestos o saturados, que pueden rectificarse reduciendo el brillo de la imagen de destino.

15 Una vez que se finalizan los ajustes de exposición para una configuración de iluminación dada, la captura de imágenes se realiza utilizando un método que se muestra en la figura 4. En el paso 164, se inicia la captura, en el paso 166, la configuración de iluminación (por ejemplo, la luz anular 110) se activa. La imagen es captada en el paso 168 por el dispositivo de captura de imágenes 104, usando esta configuración de iluminación. La captura de imágenes se repite cinco veces para cada placa de cultivo, cada vez con la misma exposición (etapa 170). El proceso se repite para el otro lado de la placa de cultivo, en el caso de una placa de cultivo dividida (etapa 172) y para otras configuraciones de iluminación, por ejemplo, para el dispositivo de iluminación inferior 114 (etapa 174). En la etapa 176, las imágenes capturadas se transfieren para el procesamiento de datos y luego se completa la captura de imágenes (etapa 178). El dispositivo de captura de imágenes puede captar cinco imágenes en un búfer, con una primera configuración de iluminación (por ejemplo, luz superior iluminada) y luego otras cinco imágenes con la segunda configuración de iluminación (por ejemplo, luz inferior iluminada). Si la placa de cultivo es una placa de cultivo dividida, con múltiples lados, entonces estos también se procesan de la misma manera. Las configuraciones de exposición se cargan desde la base de datos, y se determina la exposición correcta antes de cada captura. Para una placa de cultivo dividida, la captura de una sola placa de cultivo puede requerir  $5 \times 2 \times 2 = 20$  imágenes, lo que tomaría alrededor de 2 segundos, suponiendo que la cámara 106 funcione a razón de 9 cuadros por segundo.

30 Una vez que las imágenes han sido captadas, pueden transferirse a un hilo de ejecución separado, para su procesamiento asíncrono. La ventana de captura luego se revierte al modo espera, hasta que se ingrese un código de barras. Cada vez que se capta la imagen de una placa de cultivo, la imagen, junto con cualquier metadato relevante, se guarda en la biblioteca. Después de la captura, la placa de cultivo 102 se retira del aparato 100, a través de la puerta 120. Los datos sin procesar del dispositivo de captura de imágenes 104 se procesan para obtener datos de imágenes más precisos para la muestra que pueden usarse como entrada para el *software* de análisis.

Las imágenes capturadas pueden almacenarse en una biblioteca electrónica, LIMS u otra base de datos de almacenamiento de imágenes dedicada. Otros metadatos como el tiempo de exposición, la fecha de captura, la información de la luz, la transformación de color utilizada para corregir la imagen y los datos de la cámara pueden almacenarse en asociación con la imagen.

40 Se apreciará que aunque en el *software* descrito anteriormente se requiere que el usuario coloque la placa de cultivo e ingrese los metadatos, este proceso podría automatizarse. Por ejemplo, un brazo robotizado puede colocar la placa de cultivo en el soporte antes de la captura de imágenes y retirarla después de la captura de imágenes. El *software* podría detectar automáticamente la posición de la placa de cultivo en la imagen y si está dividida o si es una placa entera. Se puede usar un sistema robotizado para leer un identificador o código de barras en la placa de cultivo. El código de barras u otro identificador puede permitir el acceso a información, como el tipo de placa de cultivo, el tipo de muestra y el tipo de agar, de modo que el usuario no necesite ingresar esta información. En una versión del *software* destinada a un procesamiento totalmente automático, el usuario no ajustará las configuraciones de exposición o brillo del objetivo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato (100) para usar en el análisis del crecimiento microbiano en un medio de cultivo sólido en una placa de cultivo (102), en donde el aparato (100) incluye lo siguiente:
  - un dispositivo de captura de imágenes (104),
- 5 un soporte (116) para sostener la placa de cultivo (102) para el dispositivo de captura de imágenes (104), a fin de captar una imagen del medio de cultivo sólido y cualquier crecimiento microbiano,
  - una luz anular (110) entre el dispositivo de captura de imágenes (104) y el soporte (116), para iluminar difusamente un lado de la placa de cultivo (102), y
- 10 un marco (118) para colocar el dispositivo de captura de imágenes (104), el soporte (116) y la luz anular (110) uno con respecto al otro, en el que el marco (118) define una cavidad (132), de modo que el soporte (116) sostenga la placa de cultivo (102) entre el dispositivo de captura de imágenes (104) y la cavidad (132), y la cavidad (132) tiene una altura seleccionada para que la cavidad (132) proporcione un fondo negro para la imagen de el medio de cultivo sólido y cualquier crecimiento microbiano, y
- 15 en el que el marco (118) incluye una pared de la cavidad (132) que tiene dicha altura seleccionada de modo que la luz emitida por la luz anular (11) caiga sobre la pared de la cavidad (132), a fin de que proporcione el fondo negro.
2. Un aparato (100) según la reivindicación 1, en el que la luz anular (110) incluye una pluralidad de LED ordenados en una disposición circular; con preferencia, la cantidad de LED de la disposición supera los 50.
3. Un aparato (100) según la reivindicación 2, que incluye, además, un difusor asociado con la pluralidad de LED.
- 20 4. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la luz anular (110) está ubicada relativa al soporte (116), de modo que el reflejo especular de la luz proveniente de la luz anular (110), desde una superficie central del medio de cultivo sólido esté en un ángulo que no sea captado por el dispositivo de captura de imágenes (104); con preferencia, la luz anular (110) se coloca entre 30 y 50 mm por encima del soporte (116).
5. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la luz anular (110) tiene un ancho de entre 120 y 250 mm.
- 25 6. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye, además, un dispositivo de iluminación (114) para iluminar otro lado de la placa de cultivo (102), con preferencia el dispositivo de iluminación (114) es una luz de panel plano y, con preferencia, la luz de panel plano incluye una pluralidad de LED y un difusor asociado con la pluralidad de LED.
- 30 7. Un aparato (100) según la reivindicación 6, en el que la luz de panel plano ilumina un lado inferior de la placa de cultivo (102), para facilitar la visualización de los cambios de color en el medio de cultivo sólido a partir de la imagen.
8. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el soporte (116) es transparente.
9. Un aparato (100) según la reivindicación 8, en el que el soporte (116) incluye una pluralidad de dedos separados, que se extienden desde una periferia de un orificio (126), que sostiene al menos un borde de la placa de cultivo (102).
- 35 10. Un aparato según la reivindicación 8, en el que el soporte (116) incluye uno o más elementos de posicionamiento transparentes, para colocar la placa de cultivo (102) sobre el soporte (116); con preferencia los elementos de posicionamiento transparentes tienen forma triangular, con el vértice del triángulo apuntando hacia un centro del soporte (116).
- 40 11. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el marco (118) incluye una cubierta opaca (112) para sostener el soporte (116), con preferencia la cubierta opaca (112) incluye un orificio (126) que tiene un ancho que es menor que el ancho de la luz anular (110) y, con preferencia, el ancho del orificio se selecciona de modo que la luz emitida por la luz anular caiga en la pared de la cavidad para proporcionar el fondo negro.
- 45 12. Un aparato (100) según la reivindicación 1, en el que la pared incluye un deflector de luz (130).
13. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el soporte (116) incluye un dispositivo de posicionamiento configurado para colocar la placa de cultivo (102) en una posición tal que el dispositivo de captura de imágenes (104) capte la imagen del medio de cultivo sólido y cualquier crecimiento microbiano.

14. Un aparato (100) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el marco (118) incluye un recinto opaco alrededor del aparato (100), y/o el marco (118) incluye una puerta de acceso (120), para colocar la placa de cultivo (102) en el soporte (116).

5 15. Un aparato (100) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye además medios (131) para cambiar la posición de la luz anular (110) con respecto al soporte (116).

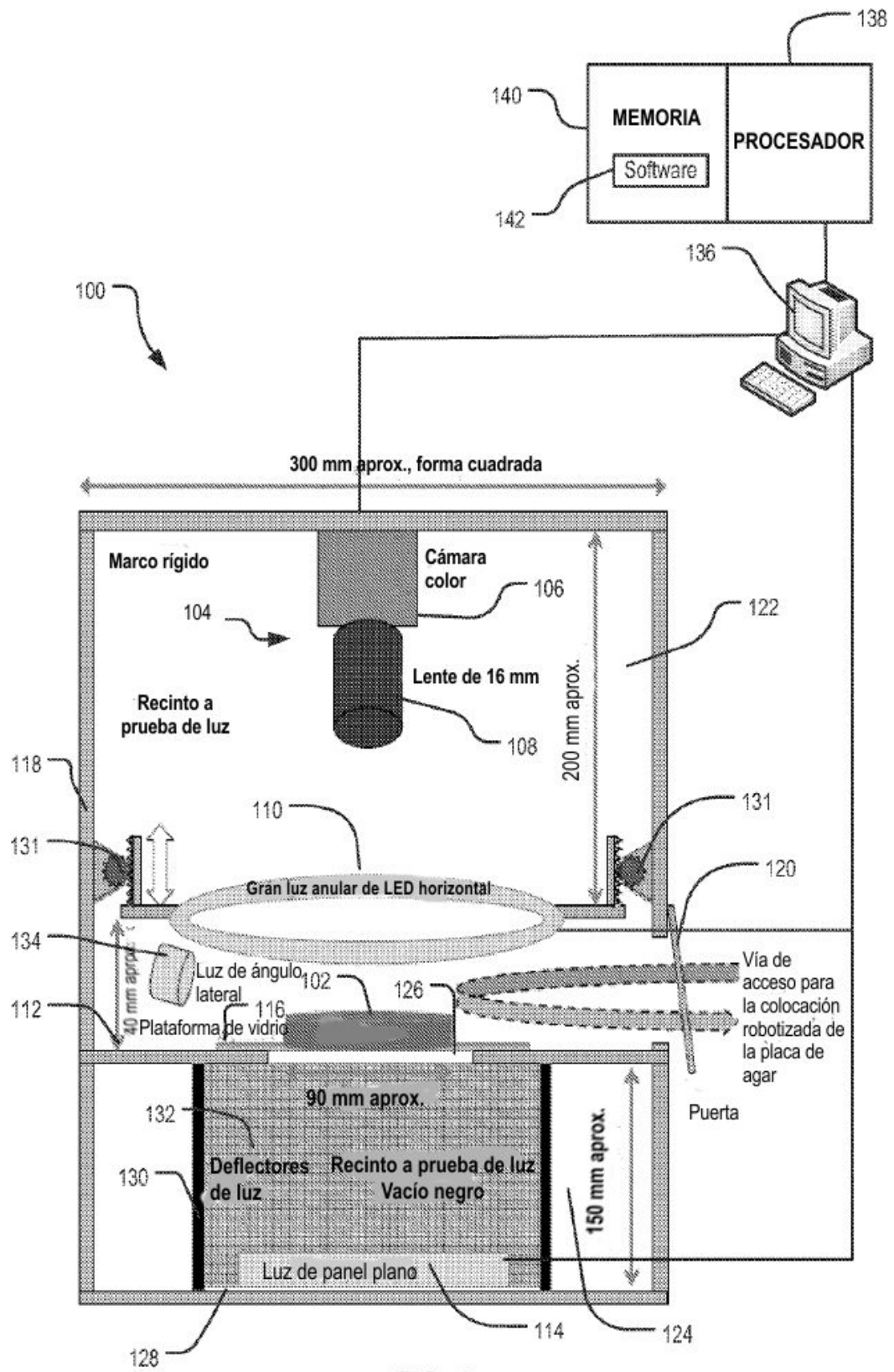


FIG. 1

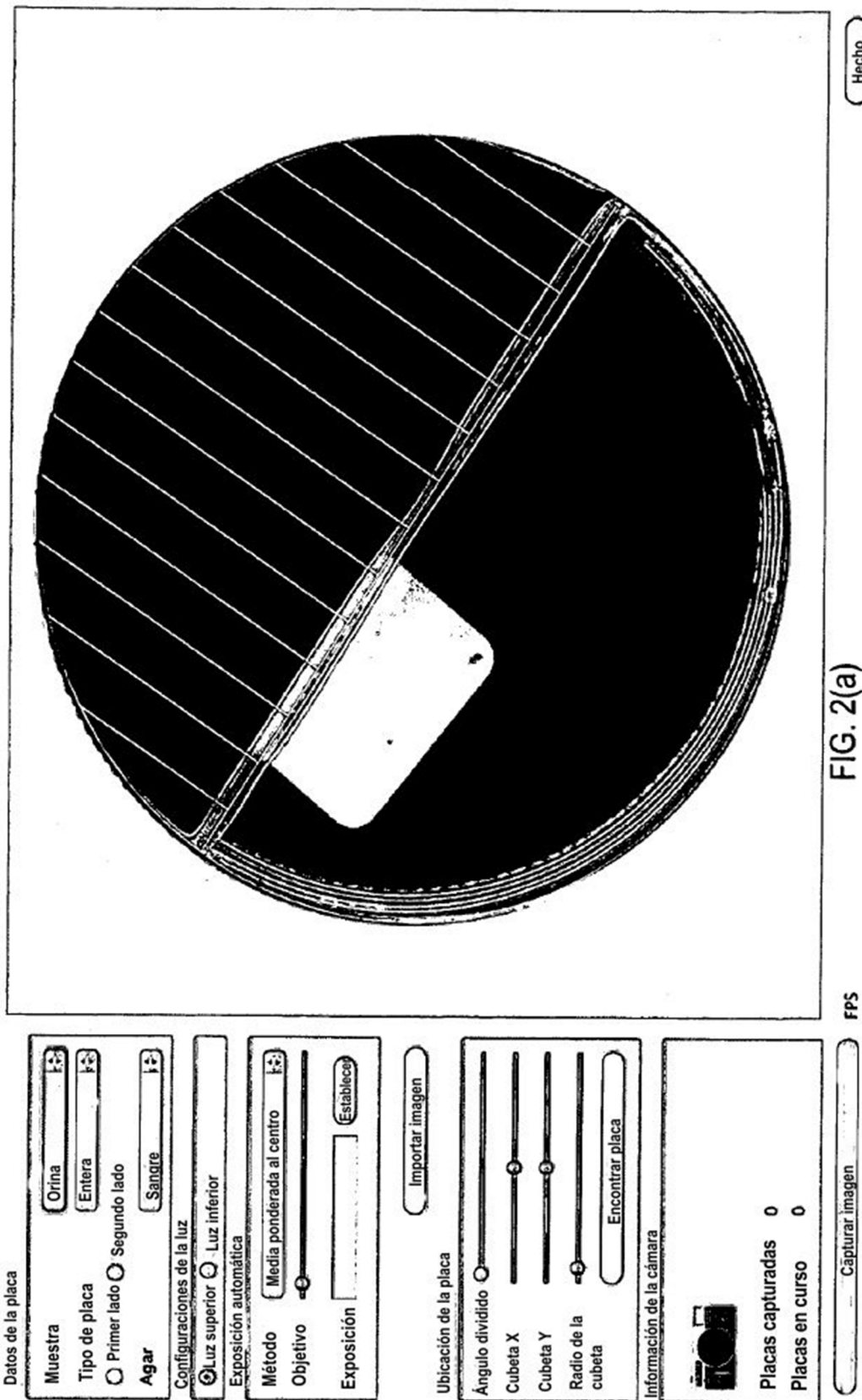


FIG. 2(a)

**Datos de la placa**

**Muestra**

**Tipo de placa**

Primer lado  Segundo lado

**Agar**

FIG. 2(b)

**Ubicación de la placa**

**Angulo dividido**

**Cubeta X**

**Cubeta Y**

**Radio de la cubeta**

FIG. 2(c)

**Exposición automática**

**Método**

**Objetivo**

**Exposición**

FIG. 2(e)

**Configuraciones de la luz**

Luz superior  Luz inferior

FIG. 2(d)

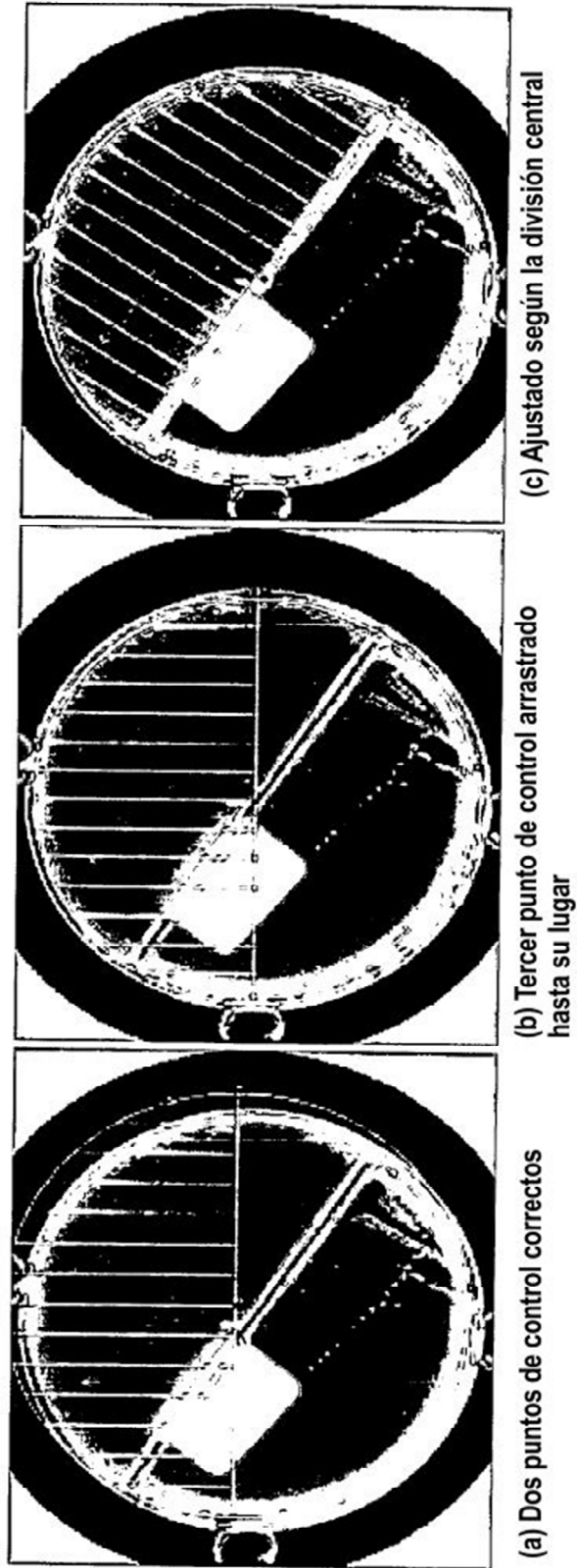


FIG. 3

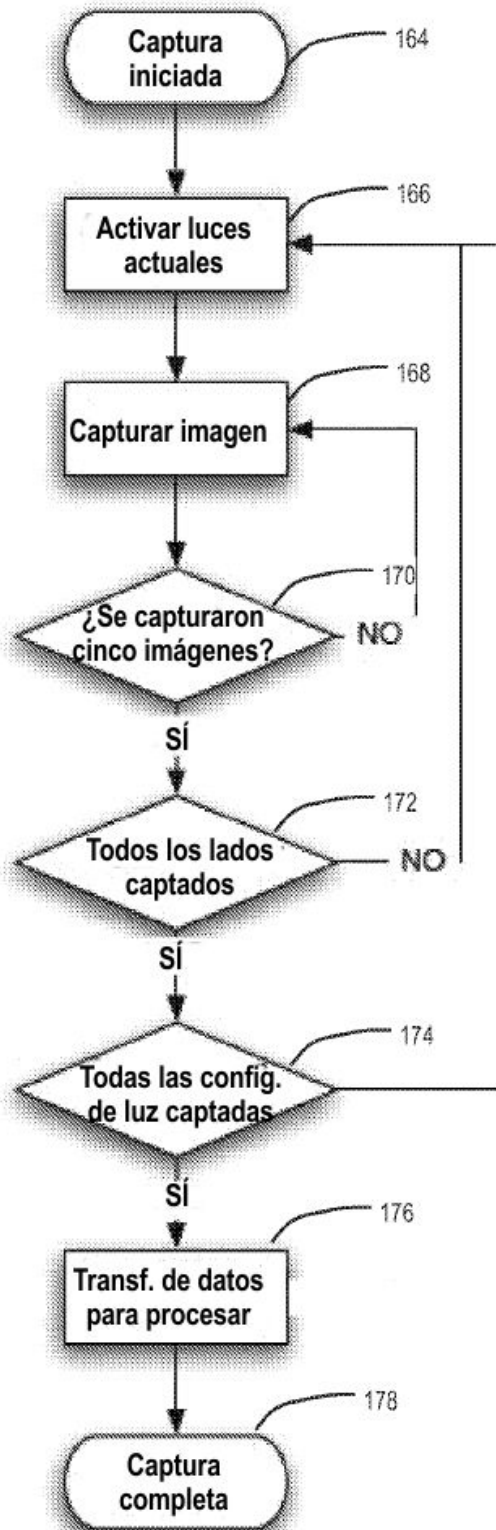


FIG. 4