

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 152**

51 Int. Cl.:

**G06T 7/00** (2007.01)

**G06T 7/11** (2007.01)

**G06T 7/136** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/EP2016/080501**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17098007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16822918 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3387615**

54 Título: **Método para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital**

30 Prioridad:

**10.12.2015 EP 15199406**

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

**09.07.2020**

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)  
Qiagen Str. 1  
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**UNTERER, THOMAS;  
SCHUSTER, GUIDO;  
LOHEL, MAIKO;  
LABITZKE, BJÖRN y  
ZERFASS, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 773 152 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 para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital

5 La presente invención se refiere a un método y a un sistema para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital. La presente invención se refiere particularmente a un método y a un sistema para determinar las posiciones de la pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones positivas verdaderas de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos.

10 La biotecnología, la medicina y los campos técnicos relacionados se basan en el análisis de moléculas. Los dispositivos electrónicos pueden analizar moléculas con alta precisión y especificidad. Especialmente en los últimos años, se han desarrollado dispositivos electrónicos automatizados para analizar grandes cantidades de muestras mediante métodos de rutina. Por ejemplo, los aparatos de secuenciación de ADN modernos se utilizan para el análisis de rutina de grandes cantidades de sondas de ADN. Las muestras de proteínas pueden analizarse mediante selección de alto rendimiento y métodos relacionados. Con frecuencia, dichos dispositivos electrónicos detectan señales fluorescentes emitidas por las sondas de muestra. Esto es posible cuando las moléculas, tales como los ácidos nucleicos o las proteínas, se han marcado con compuestos fluorescentes tales como colorantes.

15 Los aparatos de secuenciación disponibles comercialmente son capaces de secuenciar grandes cantidades de muestras marcadas con colorantes fluorescentes en paralelo. Los métodos desarrollados recientemente, denominados "secuenciación de próxima generación", NGS, han revolucionado la secuenciación. La NGS permite la secuenciación masivamente paralela de moléculas de ADN únicas o amplificadas clonalmente que se separan espacialmente en una celda de flujo o mediante la generación de una emulsión de agua y aceite. La NGS permite que miles o incluso millones a miles de millones de reacciones de secuenciación se realicen simultáneamente.

20 En la NGS, la secuenciación se realiza mediante ciclos repetidos de extensiones de nucleótidos mediadas por polimerasa o, en un formato, mediante ciclos iterativos de ligamiento de oligonucleótidos. Como proceso masivamente paralelo, la NGS genera cientos de megabases a gigabases de salida de secuencia de nucleótidos en una sola ejecución del instrumento, dependiendo de la plataforma. La producción económica de grandes volúmenes de datos de secuencia es la principal ventaja sobre los métodos convencionales.

25 Las plataformas de NGS y las aplicaciones/campos comunes para las tecnologías de NGS se revisan, por ejemplo, en Voelkerding *et al*, Clinical Chemistry 55:4 641-658, 2009 y Metzker, Nature Reviews/Genetics volumen 11, enero de 2010, páginas 31-46.

30 En la NGS, varios oligonucleótidos de interés se unen covalentemente a un soporte. Posteriormente, un nucleótido marcado con un colorante fluorescente se une a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento con ADN polimerasa. Cuando los cuatro nucleótidos se marcan con diferentes colorantes fluorescentes, pueden detectarse señales fluorescentes emitidas por una sonda y puede identificarse el tipo de nucleótido unido al oligonucleótido. Después de la detección, el colorante fluorescente se escinde y se lleva a cabo el siguiente ciclo de síntesis, en el que se une un nuevo nucleótido marcado a la cadena en crecimiento. Al llevar a cabo múltiples ciclos, la secuencia de una cadena de oligonucleótidos en crecimiento puede determinarse de una manera por etapas. Las etapas de trabajo se llevan a cabo en un aparato de secuenciación automatizado.

35 Los documentos US 2010/0323350 A1 y WO 2009/117119 A1 se refieren a métodos y composiciones para determinar la identidad de ácidos nucleicos en secuencias de nucleótidos usando, por ejemplo, datos obtenidos a partir de secuenciación por métodos de síntesis.

40 El documento WO 2008/097455 A1 se refiere a un sistema de generación de imágenes para excitar y medir la fluorescencia sobre o en muestras que comprenden materiales fluorescentes, por ejemplo marcadores fluorescentes, colorantes o pigmentos, en particular para detectar marcadores fluorescentes en ácido nucleico. Además, se da a conocer un dispositivo configurado de tal manera que se detectan simultáneamente marcadores fluorescentes en una pluralidad de plantillas de ADN diferentes.

45 El documento WO 2014/020137 A1 se refiere a un método para enriquecer secuencias diana de una biblioteca de secuenciación para proporcionar una biblioteca de secuenciación enriquecida en diana, en la que la biblioteca de secuenciación es adecuada para la secuenciación paralela masiva y comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico bicatenario. Pekka *et al*. "Evaluation of methods for detection of fluorescence labeled subcellular object in microscope images" se refiere a un estudio comparativo que incluye once algoritmos de detección o segmentación de puntos de varios campos de aplicación. Las señales fluorescentes emitidas por sondas de muestra con moléculas marcadas son débiles, pero las señales deben detectarse con alta precisión y especificidad. Por lo tanto, para dichos procedimientos se requiere un equipo óptico preciso, especialmente cámaras y tecnología de exploración.

55 Además, es necesaria una evaluación exhaustiva de las imágenes digitales capturadas por un sistema de generación de imágenes ópticas del aparato de secuenciación para obtener un resultado preciso y fiable de la secuenciación, por ejemplo en FASTQ.

Una imagen típica de luz blanca de una parte de la celda de flujo de un aparato de secuenciación comprende píxeles que representan o bien el fondo o las perlas. Para la tarea de secuenciación en un aparato de secuenciación, es importante leer y analizar las intensidades medidas de las perlas. Por lo tanto, es necesario determinar los píxeles de interés, que se refieren a las posiciones de perlas.

5 La precisión del procedimiento de detección de perlas debe ser lo más robusta y fiable posible para garantizar el correcto funcionamiento de las etapas de procesamiento posteriores en la secuenciación de genes, por ejemplo la determinación de si la perla recibió información genética o no. Por lo tanto, es necesario que sólo se tengan en cuenta las posiciones de perlas positivas verdaderas y se ignoren las posiciones positivas falsas. Dado que la  
10 precisión del procedimiento de detección depende en gran medida de la presencia de ruido y/o artefactos en la imagen de luz blanca, el método respectivo para discriminar las posiciones de perlas positivas verdaderas de las posiciones de perlas positivas falsas debe ser especialmente capaz de manejar estos objetos.

Es un objeto de la invención proporcionar un método y un sistema para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital, particularmente un método y un sistema para determinar las posiciones de la pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones positivas verdaderas de las posiciones  
15 positivas falsas de la pluralidad de objetos. El método según la presente invención se implementa por ordenador. Sin embargo, el experto en la técnica entiende que también hay otras formas de implementar el método según la presente invención.

Este objeto se logra mediante un método y un sistema según las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones de patente dependientes se refieren a realizaciones preferidas.

20 La presente invención se refiere a un método para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones candidatas positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos. La pluralidad de objetos está configurada para recibir moléculas que comprenden información genética. El método comprende la etapa de determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de  
25 intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos de los píxeles respectivos. El método comprende además la etapa de determinar la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles vecinos respectivos. El método comprende además la etapa de ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad. El método comprende además la etapa de  
30 crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local. El método comprende además la etapa de determinar una pluralidad de mínimos locales y el máximo global del histograma. El método comprende además la etapa de seleccionar uno de la pluralidad de mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos, en el que el un mínimo local se selecciona teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global. El método comprende además la etapa de usar el valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos.

40 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende además la etapa de determinar la posición de subpíxel de cada objeto de la pluralidad de objetos. En otras palabras, después de que se determinan los píxeles que corresponden a las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos, las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos se determinan en una escala de subpíxeles. Preferiblemente, las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos se determinan mediante ajuste de parábola de los píxeles  
45 determinados así como los píxeles vecinos correspondientes que corresponden a las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos. Un ejemplo de ajuste de parábola puede encontrarse en la referencia [1].

Preferiblemente, las etapas comentadas anteriormente del método según la presente invención se ejecutan en el orden presentado anteriormente.

50 Preferiblemente, la pluralidad de píxeles vecinos consiste en los vecinos directos del píxel respectivo que tiene un valor máximo local con respecto a los valores de intensidad de la pluralidad de píxeles vecinos.

Preferiblemente, la pluralidad de píxeles vecinos comprende los vecinos directos del píxel respectivo que tiene un valor máximo local con respecto a los valores de intensidad de la pluralidad de píxeles vecinos.

55 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende además, entre la etapa de ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local y la etapa de crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local, la siguiente etapa: descartar o fijar los píxeles ponderados que tienen un valor de intensidad ponderado por encima de un primer umbral  $t_{w1}$  o por debajo de un segundo umbral  $t_{w2}$ .

5 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende además, entre la etapa de ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local y la etapa de crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local y más preferiblemente después de la etapa de descartar o fijar los píxeles ponderados, la siguiente etapa: ajustar a escala los píxeles ponderados con una escala logarítmica.

Preferiblemente, el al menos un objeto es una perla que está configurada preferiblemente para recibir ADN y/o ARN.

10 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende la etapa de eliminar y/o fijar al menos un píxel de la imagen digital que tiene una intensidad por debajo de un primer umbral  $t_{e1}$  o por encima de un segundo umbral  $t_{e2}$  antes de la etapa de determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos de los píxeles respectivos.

15 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende la etapa de eliminar la iluminación desigual en la imagen digital. Preferiblemente, la etapa de eliminar la iluminación desigual en la imagen digital se realiza antes de la etapa de determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos del píxeles respectivos y más preferiblemente después de la etapa de eliminar y/o fijar al menos un píxel de la imagen digital que tiene una intensidad por debajo de un primer umbral  $t_{e1}$  o por encima de un segundo umbral  $t_{e2}$ .

Preferiblemente, la etapa de eliminar la iluminación desigual en una imagen digital comprende al menos una de las siguientes etapas, preferiblemente en el siguiente orden:

- 20 - aplicar un filtro de paso bajo a una copia de la imagen digital;
- dividir la imagen digital por la copia filtrada de paso bajo de la imagen digital;
- dividir la imagen digital en una pluralidad de N teselas;
- determinar un primer valor de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  y un segundo valor de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas con  $t_{hi\_n} > t_{lo\_n}$ ;
- 25 - crear una primera matriz  $m_1$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  para las N teselas y crear una segunda matriz  $m_2$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  para las N teselas;
- aplicar un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ ;
- aumentar a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$ , teniendo ambas matrices  $m_1'$  y  $m_2'$  el tamaño original de la imagen digital; y
- 30 - normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital teniendo en cuenta el valor correspondiente de la primera matriz  $m_1'$  y el valor correspondiente de la segunda matriz  $m_2'$ .

35 Preferiblemente, el filtro de paso bajo aplicado a la copia de la imagen digital es un filtro gaussiano. Preferiblemente, cada tesela de las N teselas tiene la misma longitud  $1_1$  en una primera dirección y la misma longitud  $1_2$  en una segunda dirección que es perpendicular a la primera dirección. Preferiblemente,  $1_1 = 1_2$ . Preferiblemente,  $1_1 = 1_2 = 64$  píxeles. Preferiblemente, el tamaño de la primera matriz  $m_1$  y la segunda matriz  $m_2$  es de  $52 \times 39$ . Preferiblemente, el tamaño de la imagen digital es de  $3296 \times 2472$ . Preferiblemente, la etapa de aumentar a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$  se realiza usando interpolación bicúbica.

40 Preferiblemente, el método según la presente invención comprende además la siguiente etapa después de la etapa de aumentar a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$  y antes de la etapa de normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital: aplicar un filtro de paso bajo a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de paso bajo a la segunda matriz  $m_2$ . Preferiblemente, el filtro de paso bajo es gaussiano.

45 Preferiblemente, la etapa de normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital se realiza mediante una transformación lineal.

Preferiblemente, la transformación lineal puede calcularse de la siguiente manera:

$$\hat{v}(x, y) = \frac{v(x, y) - m_1'(x, y)}{m_2'(x, y) - m_1'(x, y)}$$

donde  $\hat{v}(x, y)$  es el valor de intensidad normalizado del píxel respectivo de la imagen digital,  $v(x, y)$  es el valor de intensidad del píxel no normalizado de la imagen digital,  $m_1'(x, y)$  es el valor correspondiente de la primera matriz

aumentada a escala  $m_1'$  y  $m_2'(x,y)$  es el valor correspondiente de la segunda matriz aumentada a escala  $m_2'$ .

La presente invención también se refiere a un producto de programa informático que comprende uno o más medios legibles por ordenador que tienen instrucciones ejecutables por ordenador para realizar las etapas del método de uno de los métodos mencionados anteriormente.

- 5 La presente invención también se refiere a un sistema para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos.

Preferiblemente, la pluralidad de objetos se configuran para recibir moléculas que comprenden información genética.

- 10 Preferiblemente, el sistema está configurado para llevar a cabo las etapas de cualquiera de los métodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

El sistema según la presente invención comprende una primera unidad configurada para determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos de los píxeles respectivos.

- 15 El sistema según la presente invención comprende además una segunda unidad configurada para determinar la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de los píxeles vecinos respectivos.

- 20 El sistema comprende además una tercera unidad configurada para ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad.

El sistema comprende además una cuarta unidad configurada para crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local.

- 25 El sistema comprende además una quinta unidad configurada para determinar una pluralidad de mínimos locales y el máximo global del histograma.

El sistema comprende además una sexta unidad configurada para seleccionar uno de los mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos, en el que el un mínimo local se selecciona teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global.

- 30 El sistema comprende además una octava unidad configurada para usar el valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos.

Preferiblemente, el sistema comprende una unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual.

- 35 Preferiblemente, la unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual comprende al menos uno de los siguientes:

- una unidad configurada para aplicar un filtro de paso bajo a una copia de la imagen digital;

- una unidad configurada para dividir la imagen digital por la copia filtrada de paso bajo de la imagen digital;

- una unidad configurada para dividir la imagen digital en una pluralidad de N teselas;

- 40 - una unidad configurada para determinar un primer valor de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  y un segundo valor de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas con  $t_{hi\_n} > t_{lo\_n}$ ;

- una unidad configurada para crear una primera matriz  $m_1$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  para las N teselas y crear una segunda matriz  $m_2$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  para las N teselas;

- 45 - una unidad configurada para aplicar un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ ;

- una unidad configurada para aumentar a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$ , teniendo ambas matrices  $m_1'$  y  $m_2'$  el tamaño original de la imagen digital; y

- una unidad configurada para normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital teniendo en

cuenta el valor correspondiente de la primera matriz  $m_1$  y el valor correspondiente de la segunda matriz  $m_2$ .

Preferiblemente, la unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual comprende además una unidad que está configurada para aplicar un filtro de paso bajo a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de paso bajo a la segunda matriz  $m_2$ . Más preferiblemente, la unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual comprende además una unidad que está configurada para aplicar un filtro de paso bajo a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de paso bajo a la segunda matriz  $m_2$  después de haberse aplicado un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y haberse aplicado un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ .

La presente invención se explicará con más detalle a continuación con referencia a realizaciones a modo de ejemplo preferidas y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

10 la figura 1 muestra una imagen de luz blanca a modo de ejemplo, una sección ampliada de la misma así como la determinación de un píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de sus píxeles directamente vecinos según una realización de la presente invención;

la figura 2 muestra un histograma a modo de ejemplo según una realización preferida de la invención;

15 la figura 3 muestra un bosquejo a modo de ejemplo de una imagen de luz blanca que tiene una iluminación desigual provocada por el efecto de viñeteado;

la figura 4 muestra un bosquejo a modo de ejemplo de una división de una imagen de luz blanca que tiene una iluminación desigual en una pluralidad de teselas según una realización de la presente invención;

la figura 5 muestra un sistema a modo de ejemplo según una realización preferida de la presente invención;

la figura 6 muestra un sistema a modo de ejemplo según otra realización preferida de la presente invención; y

20 la figura 7 muestra una unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual según una realización preferida de la presente invención.

La figura 1 muestra en el lado izquierdo una imagen digital a modo de ejemplo que representa una denominada imagen de luz blanca, es decir, una imagen digital que se obtiene usando un sistema de generación de imágenes ópticas durante la iluminación de luz blanca reflectante. Con fines ilustrativos, la imagen digital a modo de ejemplo se invierte en color. La imagen de luz blanca comprende perlas, es decir, objetos que están configurados para recibir ADN o ARN en la superficie. Tales perlas están disponibles por ejemplo comercialmente, por ejemplo de Thermo Fisher Scientific Inc., por ejemplo bajo la marca Dynabeads, véase la referencia [2]. La imagen de luz blanca en el lado izquierdo de la figura 1 comprende además artefactos que han de distinguirse de las perlas reales así como las posiciones de perlas reales. El lado derecho de la figura 1 muestra una sección ampliada a modo de ejemplo de la imagen de luz blanca a modo de ejemplo del lado izquierdo de la figura 1. Según la presente invención, se elige un píxel de la imagen de luz blanca y se determina si este píxel tiene un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de sus píxeles vecinos. Según esta realización preferida, sólo se tienen en cuenta los píxeles directamente adyacentes. Sin embargo, el experto en la técnica entiende que también pueden tenerse en cuenta más píxeles vecinos, por ejemplo no sólo los vecinos directos, es decir, los vecinos más próximos, sino también por ejemplo los siguientes vecinos más próximos. Un píxel a modo de ejemplo que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de sus píxeles vecinos se muestra en el lado derecho de la figura 1 en la sección ampliada. El píxel que tiene un valor de intensidad máximo local está marcado con una "X" en un cuadrado de un patrón de 3x3 y sus píxeles vecinos están en contacto directo con dicho píxel en el patrón.

40 Se analiza cada píxel de la imagen de luz blanca y se determina si el píxel respectivo tiene un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de sus píxeles vecinos. De esta manera, se determina una pluralidad de píxeles, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a sus respectivos píxeles vecinos.

Estos píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local son candidatos para posibles posiciones de perlas.

45 En una etapa siguiente, se determina la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de los píxeles vecinos respectivos. Por ejemplo, en la sección ampliada en el lado derecho de la figura 1, se determina la varianza del valor de intensidad que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad de cada píxel en el patrón 3x3. Esta determinación de la varianza del valor de intensidad del píxel que tiene un valor de intensidad máximo local se repite para cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local.

Una de las ventajas de calcular la varianza del valor de intensidad del píxel que tiene un valor de intensidad máximo local así como la varianza del valor de intensidad de sus píxeles vecinos es que la varianza de los píxeles de perlas, es decir, las posiciones de perlas reales, es mayor que la varianza de los picos locales en "vacío", por ejemplo

regiones de imagen que se refieren a posiciones positivas falsas.

5 En una etapa siguiente, el valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local se pondera mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad del píxel respectivo. En otras palabras, una imagen de varianza se interpreta como un filtro de paso alto, donde se suprimen los elementos de alta frecuencia, como las perlas, el paso y las estructuras de baja frecuencia. Por lo tanto, sólo se necesita un valor escalar por píxel, a saber, el valor de intensidad ponderado, para una consideración adicional.

10 En una etapa siguiente, se fijan los píxeles ponderados que tienen un valor de intensidad ponderado por debajo de un primer umbral  $t_{w1}$  o por encima de un segundo umbral  $t_{w2}$ . La limitación del rango dinámico al descartar el límite inferior y superior da como resultado un histograma bimodal más extendido, que se describirá a continuación, ya que garantiza que los valores atípicos no compriman innecesariamente los puntos de datos relevantes en muy pocas barras del histograma mencionado a continuación. Esta extensión respalda la robustez y fiabilidad del próximo procedimiento de determinación de umbral.

15 En una etapa siguiente, los píxeles ponderados se ajustan a escala con una escala logarítmica. El ajuste a escala logarítmico respalda aún más la extensión de las dos clases en el histograma bimodal que se describe a continuación.

En una etapa siguiente, se crea un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local. Así, sólo un valor escalar por píxel, es decir, el valor de intensidad ponderado, se coloca en el histograma.

En una etapa siguiente, se determinan una pluralidad de mínimos locales y el máximo global del histograma.

20 En una etapa siguiente, se selecciona uno de los mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos. El mínimo local se selecciona teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global. En otras palabras, se selecciona el mínimo derecho o izquierdo al lado del máximo global. Si el máximo global está en la parte derecha del histograma, entonces se busca el mínimo izquierdo.

25 Si el máximo global está en la parte izquierda del histograma, entonces se busca el mínimo derecho. Una de las ventajas de considerar un histograma bimodal es que pueden esperarse dos posiciones pico, que representan aproximadamente las dos clases subyacentes, es decir, las posiciones positivas verdaderas y las posiciones positivas falsas de las perlas. Basándose en el máximo del pico, se decide en qué dirección se debe aplicar la búsqueda del mínimo más cercano. Por ejemplo, cuando el pico máximo corresponde a los valores positivos verdaderos, entonces el mínimo local se busca en el lado izquierdo y en el caso de un máximo que corresponde a valores positivos falsos, el mínimo local se busca en el lado derecho. La diferenciación de si un máximo pertenece a la clase positiva falsa o verdadera se basa en la posición central del histograma, ya que los valores positivos falsos, es decir, los valores discriminantes bajos se ubican típicamente en la parte izquierda del histograma y los valores positivos verdaderos, es decir los valores discriminantes altos se ubican en la parte derecha del histograma.

35 En una etapa siguiente, se determinan los píxeles que corresponden a las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos. Esto se realiza usando el valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos. En otras palabras, el valor del mínimo determinado se usa como umbral para discriminar las posiciones de perlas positivas verdaderas de las posiciones de perlas positivas falsas.

40 Además, las posiciones de perlas pueden calcularse en una escala de subpíxeles, por ejemplo mediante ajuste de parábola. Un ejemplo de un ajuste de parábola se facilita en la referencia [1].

Un histograma bimodal según una realización preferida de la presente invención se muestra a modo de ejemplo en la figura 2. En el histograma, el máximo global corresponde a valores positivos verdaderos y el mínimo local se busca en el lado izquierdo de dicho máximo global.

45 En caso de que durante la captura de la imagen de luz blanca se produzca una iluminación desigual, se prefiere una etapa de preprocesamiento antes del método antes mencionado para discriminar las posiciones positivas verdaderas de las posiciones positivas falsas.

50 La figura 3 muestra un bosquejo a modo de ejemplo de una iluminación desigual provocada por el denominado efecto de viñeteado. El efecto de viñeteado se refiere a una reducción del brillo o la saturación de una imagen en la periferia en comparación con el centro de la imagen. En la figura 3, la zona con brillo reducido se muestra como una zona sombreada.

Según una realización preferida de la presente invención, se realizan las siguientes etapas para eliminar la iluminación desigual en la imagen de luz blanca:

55 En una primera etapa, se aplica un filtro gaussiano a una copia de la imagen digital. El gaussiano tiene preferiblemente un valor de sigma muy alto. Luego, la imagen digital se divide por su versión borrosa, es decir, a la

que se ha aplicado un filtro gaussiano. El filtro gaussiano tiene la característica de un filtro de paso bajo, por lo tanto conserva elementos de baja frecuencia de una imagen. Por lo tanto, es una aproximación factible de la función de iluminación, particularmente cuando el filtro utiliza un valor de sigma muy alto.

5 En una etapa siguiente, la imagen digital se divide en una pluralidad de N teselas. En otras palabras, la imagen resultante se subdivide en varias teselas. Tal división de la imagen digital que tiene una iluminación desigual se muestra a modo de ejemplo en la figura 4. Una de las ventajas de este enfoque de tesela es que los valores de percentil alto y bajo para regiones de imagen distintas pueden determinarse de manera más robusta. Estos valores se requieren en una etapa que se comenta a continuación para normalizar el contraste de la imagen.

10 En una etapa siguiente, un primer valor de intensidad umbral  $tlo_n$  y un segundo valor de intensidad umbral  $thi_n$  se determinan con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas y con  $thi_n > tlo_n$ . En otras palabras, los valores de percentil alto y bajo se determinan en regiones de imagen locales.

En una etapa siguiente, se crea una primera matriz  $m_1$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $tlo_n$  para las N teselas y se crea una segunda matriz  $m_2$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $thi_n$  para las N teselas.

15 En la siguiente etapa, se aplica un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y se aplica un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ . Una de las ventajas de aplicar un filtro de mediana es que se suprimen los valores atípicos.

20 En la siguiente etapa, se aplica un filtro gaussiano a la primera matriz  $m_1$  y se aplica un filtro gaussiano a la segunda matriz  $m_2$ . En otras palabras, la superficie de ambas matrices se alisa. Una de las ventajas de alisar las superficies de las dos matrices es que en la etapa posterior de aumentar a escala las matrices, se evitan o suprimen las discontinuidades en las matrices aumentadas a escala.

En la siguiente etapa, la primera matriz  $m_1$  se aumenta a escala a una matriz  $m_1'$  y la segunda matriz  $m_2$  se aumenta a escala a una matriz  $m_2'$ . Después del aumento a escala, ambas matrices  $m_1'$  y  $m_2'$  tienen el tamaño original de la imagen digital. Una de las ventajas de aumentar a escala las dos matrices es que para cada posición de perla o para cada posición de perla posible existe un valor de percentil correspondiente.

25 En la siguiente etapa, cada valor de intensidad de cada píxel  $v(x,y)$  se normaliza mediante una transformación lineal utilizando la siguiente fórmula:

$$\hat{v}(x,y) = \frac{v(x,y) - m_1'(x,y)}{m_2'(x,y) - m_1'(x,y)}$$

30 donde  $\hat{v}(x,y)$  es el valor de intensidad normalizado del píxel respectivo de la imagen digital,  $v(x,y)$  es el valor de intensidad del píxel no normalizado de la imagen digital,  $m_1'(x,y)$  es el valor correspondiente de la primera matriz aumentada a escala  $m_1'$  y  $m_2'(x,y)$  es el valor correspondiente de la segunda matriz aumentada a escala  $m_2'$ . Esta etapa de normalización transforma las intensidades en un intervalo que oscila entre 0 y 1, es decir, [0,1].

La figura 5 muestra un sistema 100 a modo de ejemplo según una realización preferida de la presente invención.

En general, el sistema 100 está configurado para llevar a cabo las etapas del método tal como se comentó anteriormente.

35 El sistema 100 comprende una primera unidad 101 que determina una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos de los píxeles respectivos.

40 Después de que la primera unidad 101 ha determinado la pluralidad de píxeles, una segunda unidad 102 del sistema 100 determina la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de los píxeles vecinos respectivos.

45 Después de que la segunda unidad 102 ha determinado la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local, una tercera unidad 103 pondera el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad.

Después de que la tercera unidad 103 ha ponderado valores de intensidad, una cuarta unidad 104 del sistema 100 crea un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local.

Posteriormente, una quinta unidad 105 determina los mínimos locales y el máximo global del histograma.

50 Después de la determinación de los mínimos locales y el máximo global del histograma, una sexta unidad 106



selecciona uno de los mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos, seleccionándose el mínimo local teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global.

- 5 Posteriormente, una séptima unidad 107 determina los píxeles que corresponden a las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos aplicando el valor umbral al histograma.

La figura 6 muestra un sistema 100 a modo de ejemplo según otra realización preferida de la presente invención.

- 10 El sistema 100 comprende las mismas unidades que el sistema 100 según la realización preferida con referencia a la figura 5. Además, el sistema 100 comprende además una unidad 108 que está configurada para eliminar la iluminación desigual.

La figura 7 muestra una unidad 108 que está configurada para eliminar la iluminación desigual según una realización preferida de la presente invención.

En general, la unidad 108 está configurada para llevar a cabo las etapas del método de eliminar la iluminación desigual tal como se comentó anteriormente.

- 15 La unidad 108 comprende una primera unidad 108-1 que aplica un filtro de paso bajo a una copia de la imagen digital. Después de aplicar el filtro de paso bajo, una segunda unidad 108-2 del sistema 100 divide la imagen digital por la copia filtrada de paso bajo de la imagen digital. Después de eso, una tercera unidad 108-3 del sistema 100 divide la imagen digital en una pluralidad de N teselas. Después de la división en una pluralidad de teselas, una cuarta unidad 108-4 del sistema 100 determina un primer valor de intensidad umbral  $tlo_n$  y un segundo valor de intensidad umbral  $thi_n$  con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas con  $thi_n > tlo_n$ . Después de eso, una quinta unidad 108-5 del sistema 100 crea una primera matriz  $m_1$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $tlo_n$  para las N teselas y crea una segunda matriz  $m_2$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $thi_n$  para las N teselas. Después de la creación de las matrices, una sexta unidad 108-6 aplica un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y aplica un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ . Después del filtrado de mediana, una séptima unidad 108-7 aplica un filtro gaussiano a la primera matriz  $m_1$  y aplica un filtro gaussiano a la segunda matriz  $m_2$ .
- 20
- 25

- Después del filtrado gaussiano, una octava unidad 108-8 aumenta a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumenta a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$ , teniendo ambas matrices  $m_1'$  y  $m_2'$  el tamaño original de la imagen digital. Después del aumento a escala, una novena unidad 108-9 normaliza cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital teniendo en cuenta el valor correspondiente de la primera matriz  $m_1'$  y el valor correspondiente de la segunda matriz  $m_2'$ .
- 30

### Referencias

- [1] - Tian, *et al*, "Algorithms for Subpixel Registration", Comput. Vision Graph. Image Process., agosto de 1986, volumen 35, número 2, páginas 220-223;
- 35 [2] - <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/product-brand/dynal.html>

**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos, estando configurados la pluralidad de objetos para recibir moléculas que comprenden información genética, comprendiendo el método las siguientes etapas, preferiblemente en el siguiente orden:
- 5 a) determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos del píxel respectivo;
- b) determinar la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de los píxeles vecinos respectivos;
- 10 c) ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad;
- d) crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local; y
- 15 e) determinar una pluralidad de mínimos locales y el máximo global del histograma;
- f) seleccionar uno de la pluralidad de mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos, en el que el un mínimo local se selecciona teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global; y
- 20 g) usar el valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar la posición de subpíxel de cada objeto, preferiblemente mediante ajuste de parábola para los píxeles determinados.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además entre las etapas d) y e) la siguiente etapa: eliminar o fijar los píxeles ponderados que tienen un valor de intensidad ponderado por debajo de un primer umbral  $t_{w1}$  o por encima de un segundo umbral  $t_{w2}$ .
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además entre las etapas d) y e) la siguiente etapa: ajustar a escala los píxeles ponderados con una escala logarítmica.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el al menos un objeto es una perla que está configurada preferiblemente para recibir ADN y/o ARN.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además antes de la etapa a) la etapa de eliminar o fijar al menos un píxel de la imagen digital que tiene una intensidad por debajo de un primer umbral  $t_{e1}$  o por encima de un segundo umbral  $t_{e2}$ .
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de eliminar la iluminación desigual en la imagen digital.
- 35 8. Método según la reivindicación 7, en el que eliminar la iluminación desigual comprende las siguientes etapas, preferiblemente en el siguiente orden:
- a1) aplicar un filtro de paso bajo a una copia de la imagen digital;
- a2) dividir la imagen digital por la copia filtrada de paso bajo de la imagen digital;
- 40 a3) dividir la imagen digital en una pluralidad de N teselas;
- a4) determinar un primer valor de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  y un segundo valor de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas con  $t_{hi\_n} > t_{lo\_n}$ ;
- a5) crear una primera matriz  $m_{-1}$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  para las N teselas y crear una segunda matriz  $m_{-2}$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  para las N teselas;
- 45 a6) aplicar un filtro de mediana a la primera matriz  $m_{-1}$  y aplicar un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_{-2}$ ;
- a7) aumentar a escala la primera matriz  $m_{-1}$  a una matriz  $m_{-1}'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_{-2}$  a una matriz  $m_{-2}'$ , teniendo ambas matrices  $m_{-1}'$  y  $m_{-2}'$  el tamaño original de la imagen digital; y

a8) normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital teniendo en cuenta el valor correspondiente de la primera matriz  $m_{-1}'$  y el valor correspondiente de la segunda matriz  $m_{-2}'$ .

5 9. Método según la reivindicación 7, en el que el método comprende además la siguiente etapa después de la etapa a6) y antes de la etapa a7): aplicar un filtro de paso bajo a la primera matriz  $m_{-1}$  y aplicar un filtro de paso bajo a la segunda matriz  $m_{-2}$ .

10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que el aumento a escala se realiza usando interpolación bicúbica.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital se realiza mediante una transformación lineal, preferiblemente mediante

$$10 \quad \hat{v}(x, y) = \frac{v(x, y) - m_{-1}'(x, y)}{m_{-2}'(x, y) - m_{-1}'(x, y)}$$

donde  $\hat{v}(x, y)$  es el valor de intensidad normalizado del píxel respectivo de la imagen digital,  $v(x, y)$  es el valor de intensidad del píxel no normalizado de la imagen digital,  $m_{-1}'(x, y)$  es el valor correspondiente de la primera matriz aumentada a escala  $m_{-1}'$  y  $m_{-2}'(x, y)$  es el valor correspondiente de la segunda matriz aumentada a escala  $m_{-2}'$ .

15 12. Producto de programa informático que comprende uno o más medios legibles por ordenador que tienen instrucciones ejecutables por ordenador que, cuando un ordenador ejecuta el programa, hace que el ordenador lleve a cabo las etapas del método de una de las reivindicaciones anteriores.

20 13. Sistema para determinar las posiciones de una pluralidad de objetos en una imagen digital discriminando las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones candidatas positivas falsas de la pluralidad de objetos, estando configurados la pluralidad de objetos para recibir moléculas que comprenden información genética, configurado para llevar a cabo las etapas de cualquiera de los métodos según las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:

una primera unidad configurada para determinar una pluralidad de píxeles en la imagen digital, teniendo cada píxel un valor de intensidad máximo local con respecto a los valores de intensidad de una pluralidad de píxeles vecinos del píxel respectivo;

25 una segunda unidad configurada para determinar la varianza del valor de intensidad de cada píxel que tiene un valor de intensidad máximo local con respecto al valor de intensidad del píxel respectivo que tiene un valor de intensidad máximo local y el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de los píxeles vecinos respectivos;

una tercera unidad configurada para ponderar el valor de intensidad de cada uno de la pluralidad de píxeles que tienen un valor de intensidad máximo local mediante la varianza determinada respectiva del valor de intensidad;

30 una cuarta unidad configurada para crear un histograma que comprende la intensidad ponderada respectiva de cada píxel de la pluralidad de píxeles que tienen cada uno un valor de intensidad máximo local; y

una quinta unidad configurada para determinar una pluralidad de mínimos locales y el máximo global del histograma;

35 una sexta unidad configurada para seleccionar uno de los mínimos locales como valor umbral para discriminar las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos de las posiciones positivas falsas de la pluralidad de objetos, en el que el un mínimo local se selecciona teniendo en cuenta la posición del mínimo local seleccionado del histograma en relación con la posición del máximo global; y

una séptima unidad configurada para determinar los píxeles que corresponden a las posiciones positivas verdaderas de la pluralidad de objetos aplicando el valor umbral al histograma.

40 14. Sistema según la reivindicación 13, que comprende además una unidad configurada para eliminar la iluminación desigual.

15. Sistema según la reivindicación 14, en el que la unidad que está configurada para eliminar la iluminación desigual comprende:

una primera unidad configurada para aplicar un filtro de paso bajo a una copia de la imagen digital;

una segunda unidad configurada para dividir la imagen digital por la copia filtrada de paso bajo de la imagen digital;

45 una tercera unidad configurada para dividir la imagen digital en una pluralidad de N teselas;

una cuarta unidad configurada para determinar un primer valor de intensidad umbral  $t_{lo\_n}$  y un segundo valor de intensidad umbral  $t_{hi\_n}$  con  $1 \leq n \leq N$  para cada tesela de la pluralidad de N teselas con  $t_{hi\_n} > t_{lo\_n}$ ;

una quinta unidad configurada para crear una primera matriz  $m_1$  que comprende los primeros valores de intensidad umbral  $tlo_n$  para las N teselas y crear una segunda matriz  $m_2$  que comprende los segundos valores de intensidad umbral  $thi_n$  para las N teselas;

5 una sexta unidad configurada para aplicar un filtro de mediana a la primera matriz  $m_1$  y aplicar un filtro de mediana a la segunda matriz  $m_2$ ;

una séptima unidad configurada para aumentar a escala la primera matriz  $m_1$  a una matriz  $m_1'$  y aumentar a escala la segunda matriz  $m_2$  a una matriz  $m_2'$ , teniendo ambas matrices  $m_1'$  y  $m_2'$  el tamaño original de la imagen digital; y

10 una octava unidad configurada para normalizar cada valor de intensidad de cada píxel de la imagen digital teniendo en cuenta el valor correspondiente de la primera matriz  $m_1'$  y el valor correspondiente de la segunda matriz  $m_2'$ .

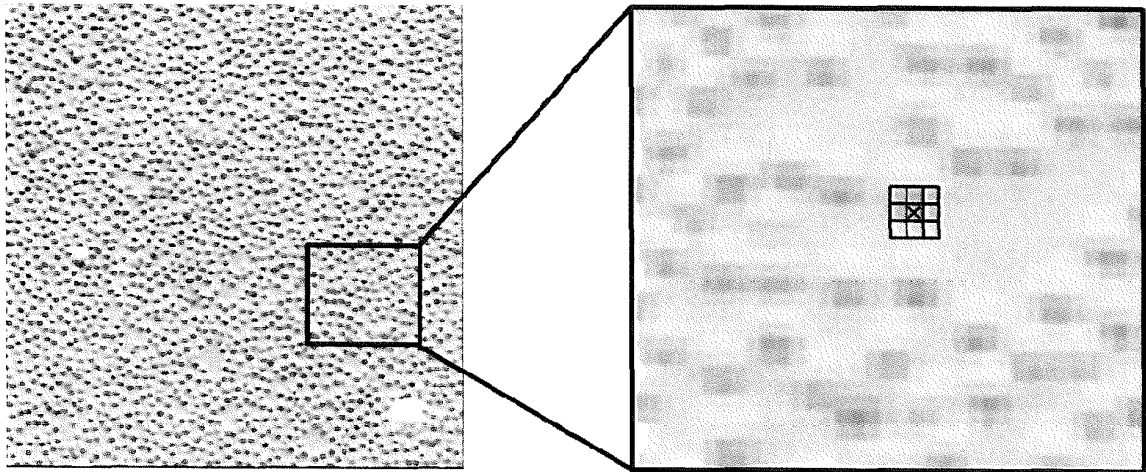


Fig. 1

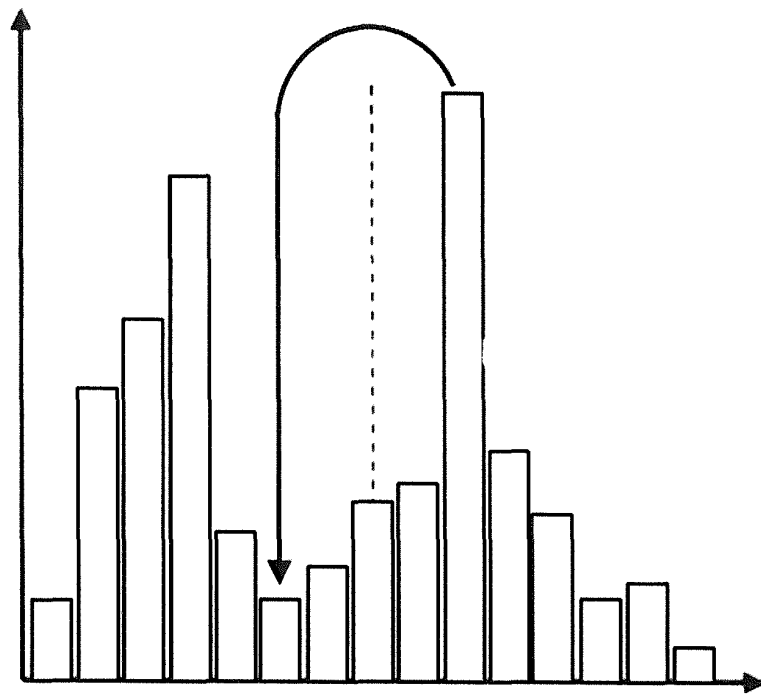


Fig. 2

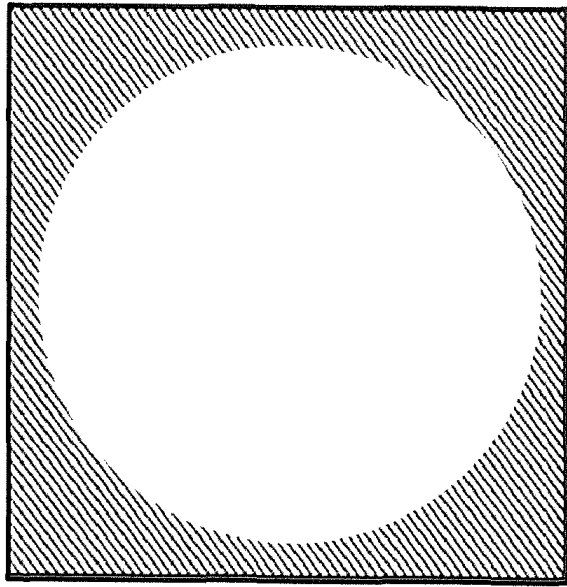


Fig. 3

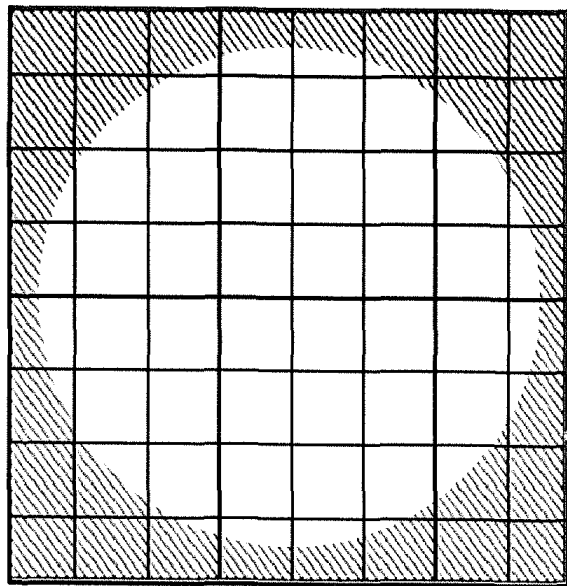


Fig. 4

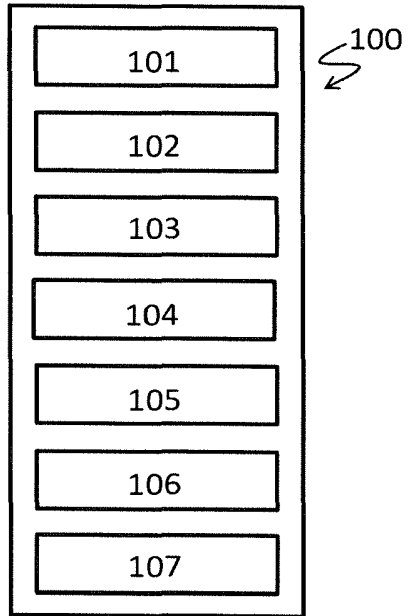


Fig. 5

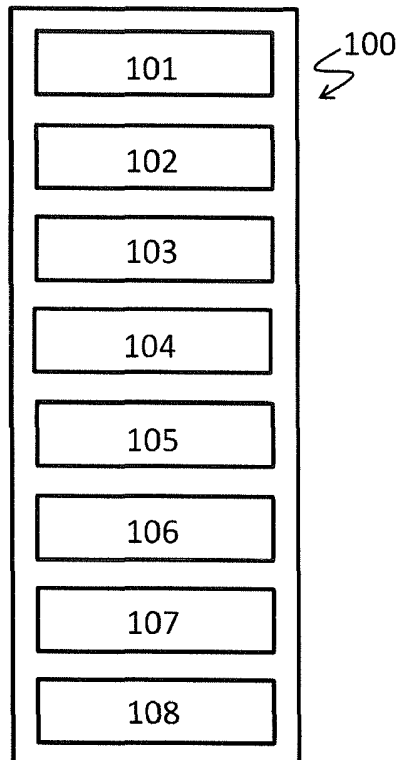


Fig. 6

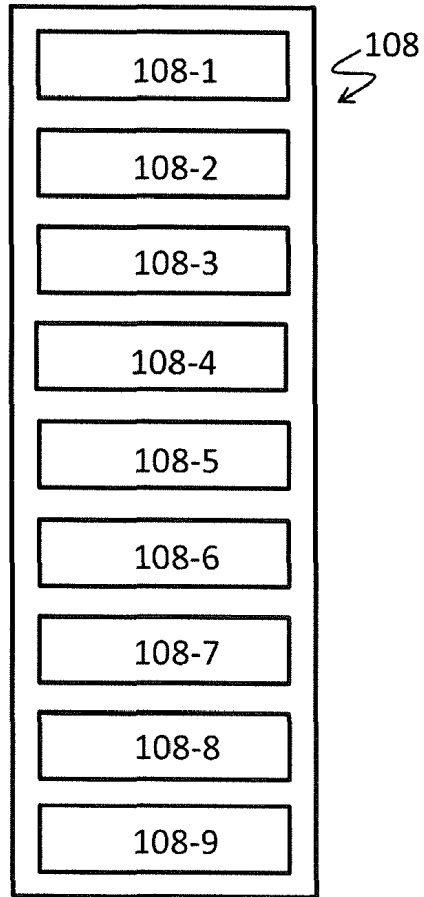


Fig. 7