

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 927**

21 Número de solicitud: 201830982

51 Int. Cl.:

G02B 21/08 (2006.01)

G06T 7/60 (2007.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.04.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (55.0%)**
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(45.0%)

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ BUENO, Carlos;
CRISTOBAL PÉREZ, Gabriel;
RUIZ SANTAQUITERIA ALEGRE, Jesús y
BUENO GARCÍA, Gloria

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **SISTEMA Y MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS EN MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN**

57 Resumen:

Sistema y método de identificación de partículas en microscopía de transmisión

La presente invención se refiere a un sistema automático, programable y adaptativo de bajo coste que permite llevar a cabo el flujo de trabajo completo de un sistema bio-indicador desde la captura al análisis y la identificación de especímenes de interés. En el caso del análisis de diatomeas, el sistema permitiría la determinación de índices de la calidad del agua. El objeto de la invención tiene aplicación directa en programas de análisis de imagen para microscopía, análisis de imágenes médicas, imagen forense, sistemas de monitorización de la calidad de agua, teléfonos móviles, entre otras. Proporciona un sistema de ayuda tanto para el experto como para el usuario final en aquellas tareas relacionadas con la identificación taxonómica automática de diatomeas así como en el cálculo de índices bióticos en la monitorización del estado ecológico de los ríos.

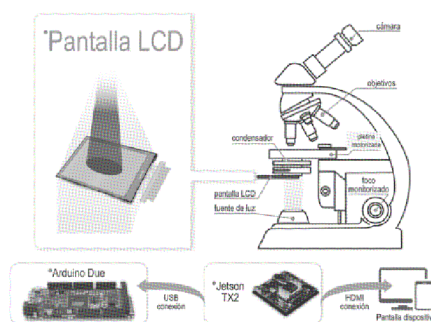


FIG.1

DESCRIPCIÓN

SISTEMA Y MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS EN MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la invención se enmarca en el campo de detección e identificación de especímenes biológicos mediante medios ópticos.

10

Más concretamente, el objeto de la invención va dirigido a la evaluación de la calidad biológica actual en ecosistemas acuáticos; si bien el sistema es extensible a otros ámbitos del área de ciencias de la vida.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las diatomeas o Bacilariofíceas son un grupo de algas unicelulares distribuidas en una gran variedad de ambientes acuáticos de todo el mundo. En la actualidad se han descrito más de 100.000 especies diferentes. En España se están actualmente implementando en ríos y lagos 20 redes de biomonitorización basadas en diatomeas, de acuerdo con los requerimientos de la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea (EC 2000), un marco legislativo destinado a proteger y mejorar los sistemas acuáticos (ríos, lagos, aguas subterráneas, aguas costeras y de transición) dentro de la Unión Europea, estableciendo la necesidad, para los países miembros, de determinar el estado ecológico de todas las masas de agua siguiendo criterios 25 científicos comunes. Entre los grupos taxonómicos propuestos en el anexo V de la Directiva para su uso como bioindicadores de la calidad del agua, se recomienda entre otros el empleo de las comunidades fitobentónicas. Dentro del fitobentos, las diatomeas son el grupo generalmente más representativo, reuniendo una serie de particularidades que las convierten en organismos idóneos para tal fin. El principal factor limitante para la consolidación de las 30 diatomeas como indicadores ecológicos radica en la dificultad de su identificación taxonómica.

El enfoque convencional en la identificación taxonómica de diatomeas ha consistido usualmente en su análisis y cuantificación mediante microscopía óptica; sin embargo existe una necesidad de aplicar técnicas de reconocimiento automatizado para obtener herramientas 35 diagnósticas (redes de vigilancia ambiental, sistemas de alerta temprana) adecuadas para

facilitar la gestión de los recursos hídricos y los procesos de toma de decisiones. En esta línea, pero en otro ámbito de aplicación, cabe citar que Google Research acaba de proponer el denominado microscopio de realidad aumentada (ARM) para la detección automática de cáncer en donde a través de un proceso de entrenamiento basado en el denominado aprendizaje profundo se le presenta en tiempo real de forma superpuesta al usuario (de ahí el nombre de realidad aumentada) una información del grado de malignidad del tejido observado. El sistema propuesto por Google aplica aprendizaje profundo en todas las etapas del proceso, incluyendo la etapa de detección de objetos. Sin embargo, el método aquí propuesto está orientado a proporcionar un sistema automático de procesamiento de muestras y análisis digital y no un sistema de realidad aumentada en tiempo real como el de Google.

Por otro lado, el análisis manual de imágenes de tales sistemas es poco práctico; debido a la enorme diversidad de este grupo de microalgas y su gran plasticidad morfológica. Estas algas resultan de gran utilidad en la monitorización de la calidad de las aguas, de ahí la importancia que la automatización de los procesos de análisis conlleva. Los nuevos sistemas de análisis de imagen ofrecen una solución potencialmente ventajosa en comparación con los métodos manuales de conteo e identificación. Además, existe la necesidad de implementar herramientas de software robustas y flexibles para la clasificación de imágenes de diatomeas, que permitan el posprocesamiento de datos para la evaluación ambiental y otras aplicaciones. La identificación del tipo y número de diatomeas se realiza a través del cálculo de índices de calidad de agua, que proporcionan un valor numérico de la estimación de la calidad de agua en base a la presencia o ausencia y número de determinadas especies de diatomeas. Según la directiva europea se requiere la identificación de un mínimo de 400 valvas con objeto de poder determinar un índice de calidad. Los tres índices más utilizados en Europa son el IPS—Índice de Polluosensibilidad Specificque, el TDI y el TI—Rott's trophic index. El estado ecológico se define a través de una escala de cinco estadios de calidad en función del grado de degradación (Alta-A, Buena-B, Moderada-MO, Deficiente-D, Mala-MA). Más recientemente, y siguiendo recomendaciones de directivas europeas (EC 2011), se propuso integrar los índices anteriores en el denominado ICM— Intercalibration Common Metric—lo que permitió disponer de una métrica común para llevar a cabo comparaciones de las diferentes medidas tomadas en varios países del arco mediterráneo.

Las diatomeas constituyen el grupo más ubicuo de algas unicelulares que juegan un papel fundamental en los ciclos del carbono y del silicio. Su tamaño oscila entre las 2 micras hasta los 2mm, midiendo en promedio entre 20-50 micras. Su esqueleto de sílice les confiere una

gran resistencia al calor a los ácidos y a la putrefacción. Las diatomeas proporcionan probablemente la herramienta más versátil e importante en la biomonitorización de ambientes acuáticos. Permiten detectar de una manera rápida los cambios en la química del agua incluyendo los contaminantes, sirviendo por tanto como indicadores de alerta temprana, mientras que los macrófitos indican un deterioro más persistente. Las diatomeas constituyen uno de los indicadores más fáciles de muestrear desde arroyos, canalización urbana o humedales.

Por otro lado, la recogida, preparación y preservación de las muestras son relativamente simples, permitiendo obtener resultados reproducibles y comparables a largo plazo. En los años 90 las diatomeas se adoptaron como indicadores indirectos en el marco de la Directiva 2000/60/CE de la UE. Según la directiva europea se requiere la identificación de un mínimo de 400 especímenes con objeto de poder determinar un índice de calidad (EC 2000). La estimación de la calidad de agua se realiza en base a la presencia o ausencia y número de determinadas especies de diatomeas. Sin embargo, existe una necesidad de aplicar técnicas de reconocimiento automatizado para obtener herramientas diagnósticas. Entre los métodos previos propuestos en la literatura, cabe destacar los que se propusieron en el proyecto ADIAC, en el que a partir de 37 especies se obtuvo un 96,9% de precisión (du Buf 2002), o más recientemente en donde (Dimitrovski et al 2012) a partir de 38 clases se obtuvieron un 97,97 % de precisión, o el propuesto por (Lai et al 2016) en el que a partir de 14 clases proporciona un 94.7% de precisión.

En general cabe señalar que los métodos de identificación desarrollados hasta el momento sólo son válidos para un subconjunto limitado de especies. Por lo tanto, los resultados son relativamente mediocres, disminuyendo el rendimiento al aumentar el número de especies.

Por otro lado, existen métodos alternativos de análisis basados en la generación de códigos de barras mediante DNA que en la actualidad presentan limitaciones a la hora de proporcionar identificaciones a nivel de especie, teniendo por otro lado un coste mayor que los basados en taxonomía (Stein 2014).

Se conocen desarrollos como el descrito en (Zheng 2017) donde se detalla un método para separar y reconocer plancton utilizando un aprendizaje profundo en imágenes de plancton microscópicas agrupadas o dispersas mediante el uso de una red neuronal convolucional (CNN). El sistema proporciona la posición de los especímenes identificados mediante

rectángulos, pero no se indica ni el número de especies analizadas ni la tasa de identificación obtenida.

De manera similar, el documento (Soh 2017) proporciona un método de clasificación de imágenes de plancton basado en una red neuronal convolucional de mediante la fusión de múltiples características basadas en la extracción de bordes y transformaciones de la imagen. El sistema proporciona el porcentaje de la probabilidad de pertenencia a una determinada clase, obteniendo tasas de clasificación altas.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto del objeto de la invención se tiene un sistema que permite la evaluación global de la calidad biológica actual en diversos ecosistemas acuáticos utilizando índices bióticos basados en la estructura de la comunidad de diatomeas. Para ello, se seleccionaron y procesaron mediante microscopía de campo claro las cien especies más representativas de las diferentes condiciones de calidad de agua. De cada especie se extrajeron un promedio de cien especímenes que se dividieron en dos grupos para ser utilizados con posterioridad por los clasificadores.

El objetivo del sistema objeto del primer aspecto de la invención es el de proporcionar a los gestores ambientales nuevos mecanismos de diagnóstico del estado ecológico en las masas de agua dulce, en cumplimiento de los requisitos establecidos por la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea (DMA), así como el diseño de procedimientos de evaluación automatizada que permitan una biomonitorización más eficiente de la calidad del agua. El sistema desarrollado constituye una ayuda importante al desarrollo en la gestión sostenible del medio ambiente y la protección de la biodiversidad en los ecosistemas acuáticos de toda Europa, y podría dar respuesta a la actual problemática planteada a nivel ecológico, económico y sociológico por los procesos de degradación ambiental que afectan a muchos de sus cuencas hidrográficas. Asimismo, dado su reducido coste económico el sistema sería accesible para países en desarrollo o emergentes como India, China o Brasil.

Por otro lado, el ámbito de aplicación del sistema desarrollado no se limita exclusivamente a la evaluación de la calidad del agua. La necesidad de implementar nuevas técnicas de identificación automática se presenta en otros campos donde la identificación de diatomeas es una técnica rutinaria; como paleolimnología, arqueología, diatomología forense, etc así como

en el análisis de otro tipo de organismos acuáticos tales como las cianobacterias, los desmids o los foraminíferos.

Asimismo, el sistema objeto de la invención podría constituir una plataforma de análisis de bajo
5 coste en aplicaciones biomédicas tales como citología, análisis de biopsias en cáncer de mama o próstata, así como la detección y conteo de parásitos en malaria en muestras de sangre. En el caso de su utilización en otro ámbito, sea biomédico, forense, etc, y en el supuesto de que las muestras a analizar no se encontraran etiquetadas, sería aconsejable contar con la asesoría de algún biólogo, taxónomo o médico que pudiera llevar a cabo dicha tarea. En caso
10 de no disponer de ningún experto, la ventaja de los métodos basado en el aprendizaje profundo es que se podría usar un modelo previamente entrenado que ha aprendido buenas características generales y las aplica a nuestro propio conjunto de datos. Para otro tipo de aplicaciones que requieran microscopía de reflexión como en la industria manufacturera, inspección o control de calidad o en el caso de epifluorescencia de muestras biológicas que
15 requieran iluminar la muestra por la parte superior, el sistema aquí propuesto se podría utilizar sin más que añadir un módulo adicional mediante impresión 3D.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

25 Figura 1.- Muestra un diagrama general del sistema de control, adquisición y procesado de imágenes considerado aquí.

Figura 2.- Muestra un esquema general del equipo desarrollado referido al primer aspecto de la invención.

30 Figura 3.- Muestra una fotografía del prototipo del sistema desarrollado.

Figura 4.- Muestra una gráfica donde se representa el espectro del LED blanco utilizado en el sistema objeto de la invención.

35

Figura 5.- Muestra la pantalla LCD, cable HDMI y adaptador 3D para su ubicación en el plano focal del condensador.

Figura 6.- Muestra una serie de imágenes capturadas por el prototipo. En la imagen se presentan 100 especies diferentes de diatomeas. Objetivo Brunel DIN parfocal 100x (0.85 NA). LED blanco ($\lambda=443\text{nm}$).

Figura 7.- Muestra una imagen donde se aprecia un ejemplo de visualización en el visible ($\lambda=443\text{nm}$) y el UV ($\lambda=365\text{nm}$) de la especie *Amphipleura pellucida*. Objetivo Brunel DIN parfocal 100x (1.25 NA).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

En un ejemplo de realización preferente, pero no limitativa, de un primer aspecto de la invención se tiene un sistema de identificación automática de partículas en microscopía de transmisión como pueden ser las diatomeas.

Para la identificación automática y el recuento de diatomeas se requiere la obtención de suspensiones de frústulos (la cubierta de sílice) libres de materia orgánica. La forma y ornamentación de los frústulos constituyen la base de la taxonomía de estas algas. Para la captura de las imágenes se utilizó el microscopio de transmisión monocular Brunel SP30 que proporciona una iluminación LED blanca ($\lambda=443\text{nm}$) (ver Fig. 3). Para la visualización de las muestras en el ultravioleta (UV), se substituyó el LED anterior por un otro con una longitud de onda $\lambda=365\text{nm}$) (Sanchez 2018). Como puede observarse en la Fig. 7, la utilización de iluminación UV permite observar las estrías de las valvas de la especie *Amphipleura pellucida*, cosa que con la luz visible no es posible. Para conseguir niveles de resolución similar o mayores habría que acudir a la utilización de microscopios electrónicos de barrido que tienen un coste varios órdenes de magnitud superior.

Para la visualización de los especímenes se utilizó un objetivo estándar Brunel DIN parfocal 60x (0.85 NA). Para el control de los motores se utilizó una placa de Arduino Due. Para la motorización en los ejes XYZ, se utilizaron tres motores NEMA 14HR08-0645. La adaptación de los motores XY a la pletina se efectuó mediante un juego de poleas y correas, mientras que en el eje Z se utilizó un acoplador 4mm-5mm junto con un adaptador de motores construido mediante una impresora 3D. Para el cambio de objetivos se utilizó un motor NEMA 17H19-

2004S1 que se acopló a la torreta de los objetivos mediante un adaptador de torreta construido mediante una impresora 3D. Para el soporte de los motores XY se construyó una pieza rectangular de aluminio que se unió a la pletina. Para el control de la iluminación se utilizó una pantalla Adafruit TFT de 1,8" con una resolución de 160x128 que se ubicó en el plano focal del condensador (Fig. 1). El control de dicha pantalla TFT es programable a través de la tarjeta Arduino Due o bien de forma autónoma mediante una tarjeta Raspberry Pi Zero (Fig. 5).

El prototipo se ha montado en el interior de una caja de metacrilato de 6mm de espesor que permite una protección completa frente a la radiación UV así como frente al polvo y suciedad ambiental, habiéndose fijado en el interior de la pared vertical posterior de la caja la placa controladora Arduino así como la placa de procesamiento Jetson TX2. En la parte inferior de la caja se habilitó un espacio para ubicar las fuentes de alimentación y el cableado. En el laboratorio de la Unidad de Radiometría del Instituto de Óptica se efectuaron medidas de calibración de la transmitancia espectral del metacrilato, pudiéndose verificar valores muy próximos a 0 en el rango de longitudes de onda entre 288-380nm, por lo que el sistema proporciona protección suficiente para poder trabajar en el ultravioleta. Para la captura de imágenes se utilizó la cámara DMK72 de Imaging Source (5Mpixel). La placa Jetson TX2 en la que se instaló en sistema operativo Ubuntu actúa como centro de procesamiento y control ya que se conecta a la tarjeta Arduino a través de una conexión USB, permitiendo asimismo la visualización y almacenamiento de los resultados obtenidos. Para la impresión 3D se utilizó una impresora BQ modelo Witbox2 y filamento PLA de 1,75mm. Asimismo, se construyeron mediante impresión 3D diferentes adaptadores, filtros, soportes, etc no descritas aquí, pero cuyos diseños se encuentran disponibles bajo demanda. La ventaja fundamental de la impresión 3D es que permite disponer en un corto espacio de tiempo y a un coste reducido diferentes piezas mecánicas cuyo coste sería varios órdenes de magnitud mayor si se construyeran a medida en un taller mecánico. Otra ventaja importante es su adaptabilidad a diferentes configuraciones y disponer de prototipos en un corto espacio de tiempo.

Las principales etapas necesarias para crear un conjunto de datos de este tipo son: selección de especies, adquisición de imágenes y etiquetado de datos. En relación con la toma de muestras, se seleccionaron las 100 especies de diatomeas más representativas en términos de abundancia relativa y ocurrencia (Fig. 5). Las muestras fueron recogidas durante los años 2003-2015 en la cuenca del Duero (España) por el Dr. Saúl Blanco (Univ. de León). De cada especie se seleccionaron 100 especímenes para cada clase que fueron recortadas y etiquetadas por el citado taxónomo.

Por otro lado, cabe señalar que se llevaron a cabo diferentes pruebas de verificación en la identificación de las diatomeas que aparecen en la Fig. 6 mediante dos técnicas de análisis alternativas:

A) En (Bueno 2017) se efectuó una extracción manual de descriptores y se aplicó un clasificador basado en B-DT (Bagged Decision Trees) obteniéndose un 98,11% de precisión.

B) En (Pedraza 2017) se aplicaron técnicas de aprendizaje profundo mediante las denominadas Convolutional Neural Networks (CNN), lo cual permitió mejorar la tasa de clasificación hasta el 99,51%.

En el sistema aquí descrito, se extrajeron un conjunto más reducido de descriptores altamente discriminantes basados en los descriptores elípticos de Fourier, congruencia de fase y funciones de Gabor. A continuación, se aplicó un análisis discriminante (reducción de dimensionalidad) junto con un método de clasificación no-supervisada (clustering) habiéndose obtenido tasas de clasificación por encima del 99% en distintos conjuntos de prueba que incluían variaciones morfológicas de los especímenes debidas al ciclo de vida de los mismos.

De esta manera se tiene que a partir de una captura imágenes por microscopio de transmisión mediante la utilización de un LED en el espectro visible generando unas imágenes de entrada, éstas se procesan mediante una metodología basada en la extracción de características discriminantes basadas en los descriptores elípticos de Fourier, congruencia de fase y funciones de Gabor, un análisis discriminante para disminuir la dimensionalidad del espacio de características, y una clasificación no supervisada mediante la obtención de agrupamientos (clustering).

REIVINDICACIONES

1. Sistema de identificación de partículas en microscopía de transmisión que comprende un microscopio de transmisión,
5 estando el sistema caracterizado por que comprende asociados a una unidad de proceso:
 - a. un motor XY configurado para generar movimiento en el plano XY y un motor Z configurado para generar movimiento en el plano Z,
 - b. un adaptador del motor XY a una pletina mediante un juego de poleas y correas,
 - 10 c. un adaptador del motor Z preferentemente ubicado en uno de los mandos del enfoque mediante un acoplador,
 - d. un motor paso a paso y un adaptador de torreta para girar la torreta de objetivos,
 - e. un adaptador de motores para fijar los motores XY al estativo del microscopio,
 - f. medios para el control programable de la iluminación destinados a permitir la
15 obtención de diferentes modalidades de visualización, y
 - g. unos medios de protección frente al ultravioleta que comprenden una caja de metacrilato que impide el paso de luz UV.

2. Sistema según reivindicación 1 donde los medios de iluminación están constituidos por
20 LED en el UV, soporte 3D de sujeción, controlador del LED y un potenciómetro.

3. Sistema según reivindicación 1 donde el motor Z comprende una lente sintonizable eléctricamente (ETL) y una placa de control Arduino.

- 25 4. Sistema según reivindicación 1 donde los medios para el control programable de la iluminación pantalla de cristal líquido (LCD) controlada a través de un protocolo HDMI para poder modificar la iluminación incidente

5. Método de identificación de partículas en microscopía de transmisión que hace uso del
30 sistema descrito en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando el método caracterizado por que comprende:
 - a. una captura imágenes por microscopio de transmisión mediante la utilización de un LED en el espectro visible generando unas imágenes de entrada, y
 - 35 b. un procesamiento de las imágenes de entrada, basado en:

5

- i. extracción de características discriminantes basadas en los descriptores elípticos de Fourier, congruencia de fase y funciones de Gabor,
- ii. realización de un análisis discriminante para disminuir la dimensionalidad del espacio de características, y
- iii. clasificación no supervisada mediante la obtención de agrupamientos (clustering).

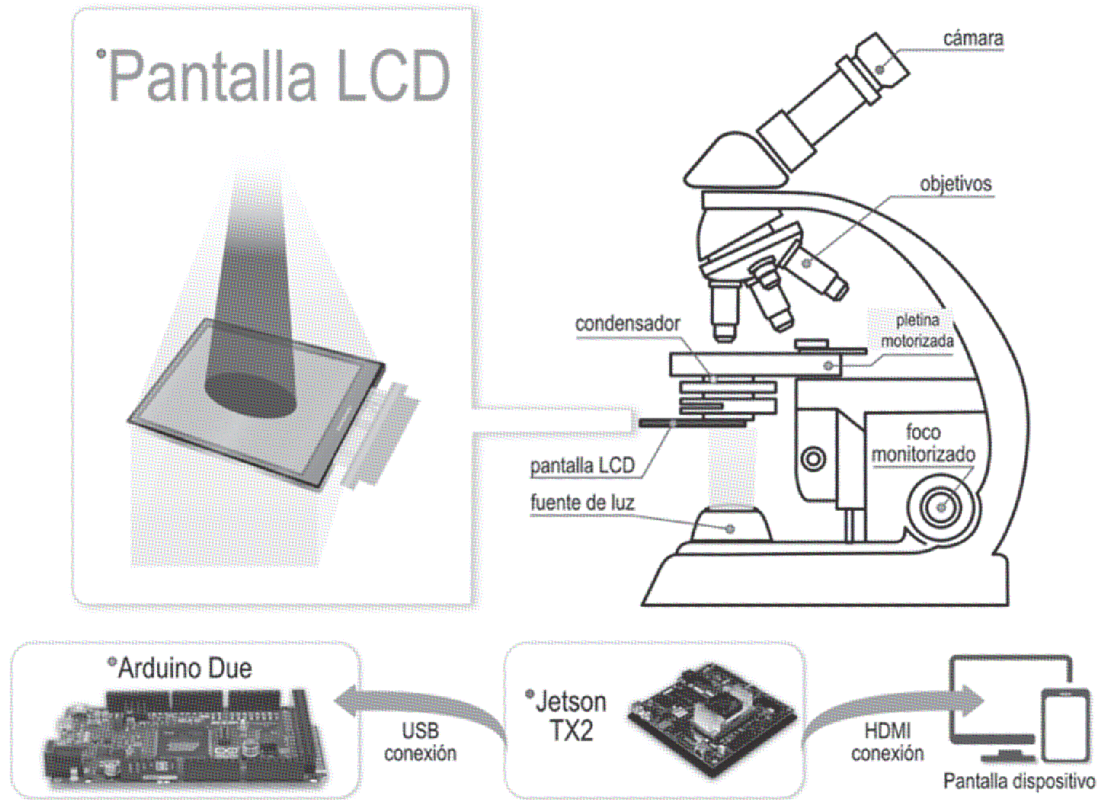


FIG.1

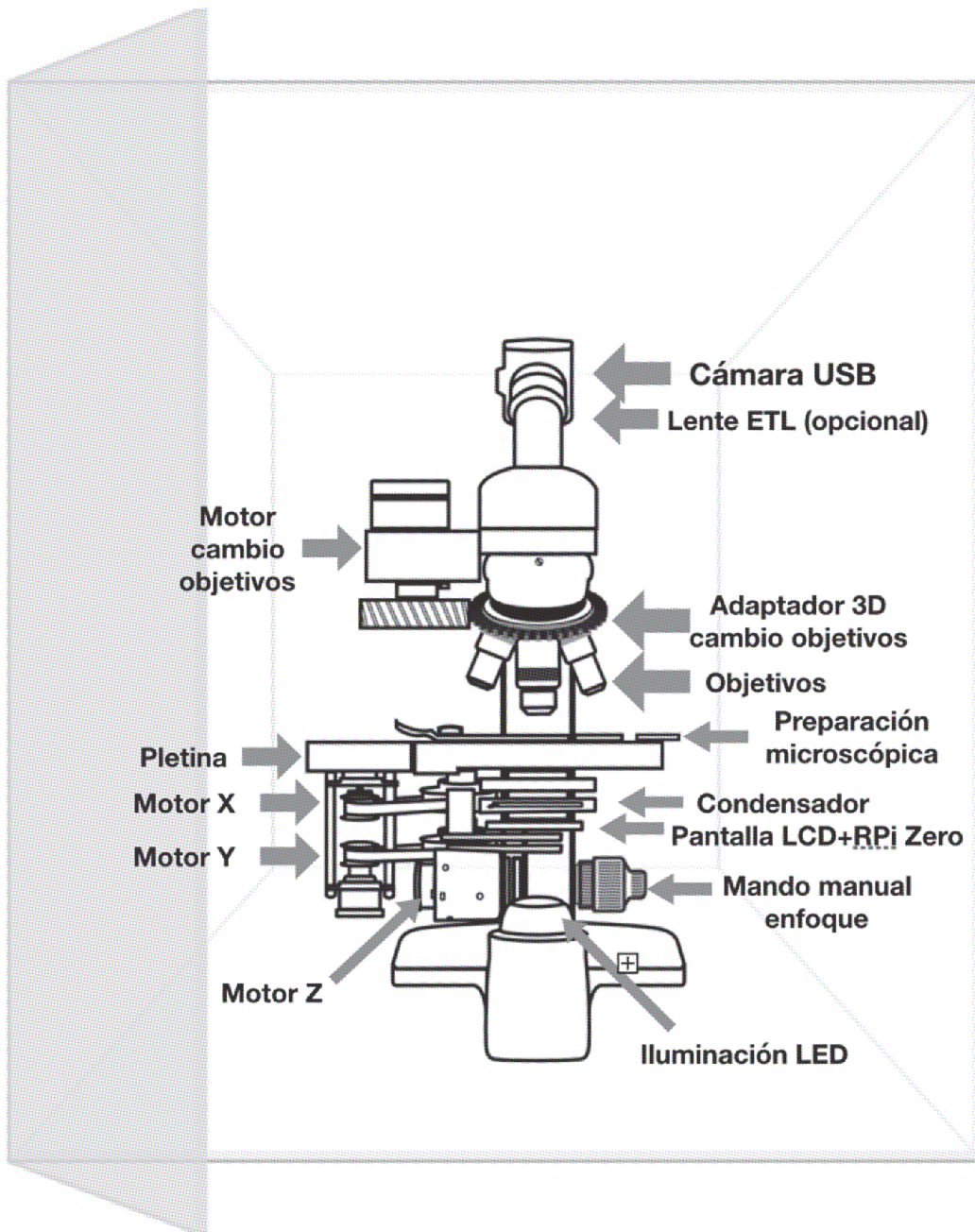


FIG.2

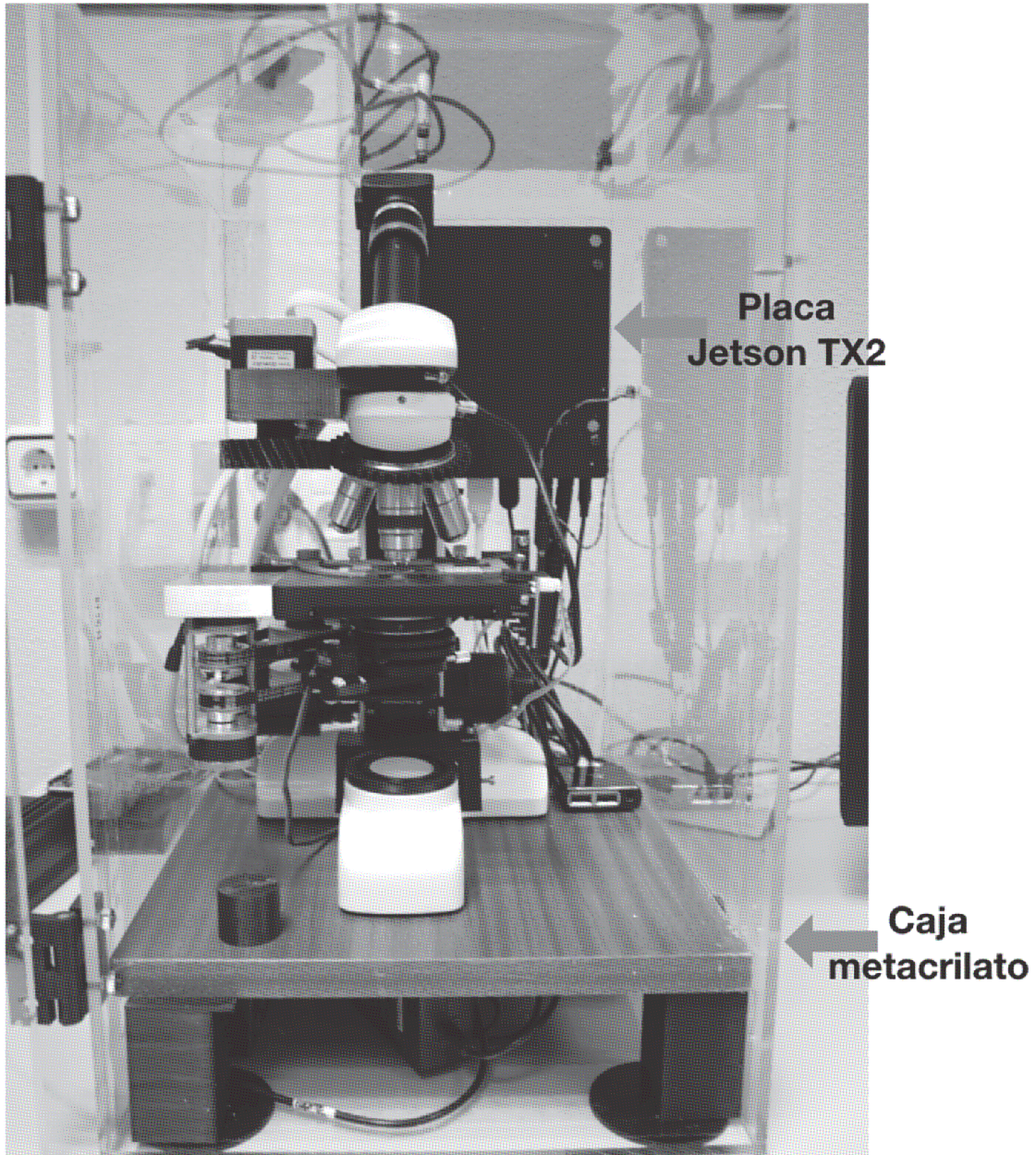


FIG. 3

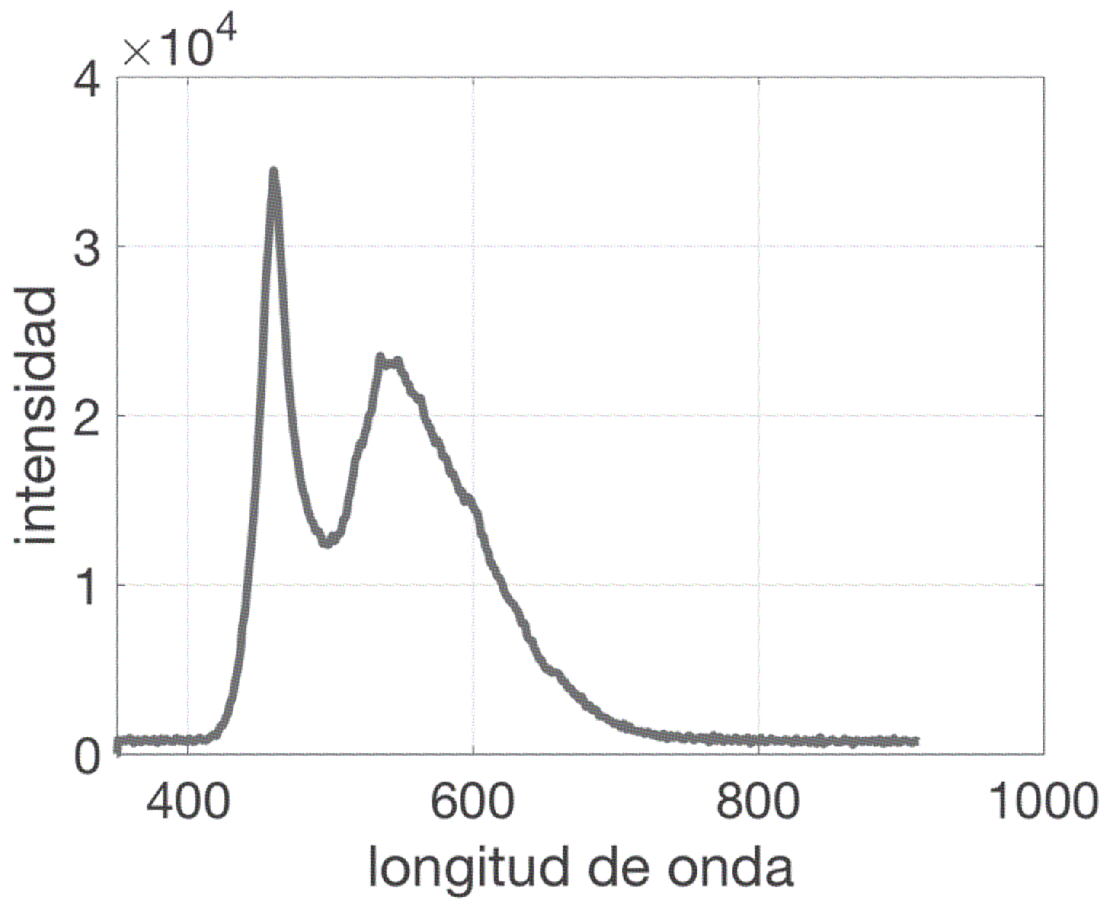


FIG. 4

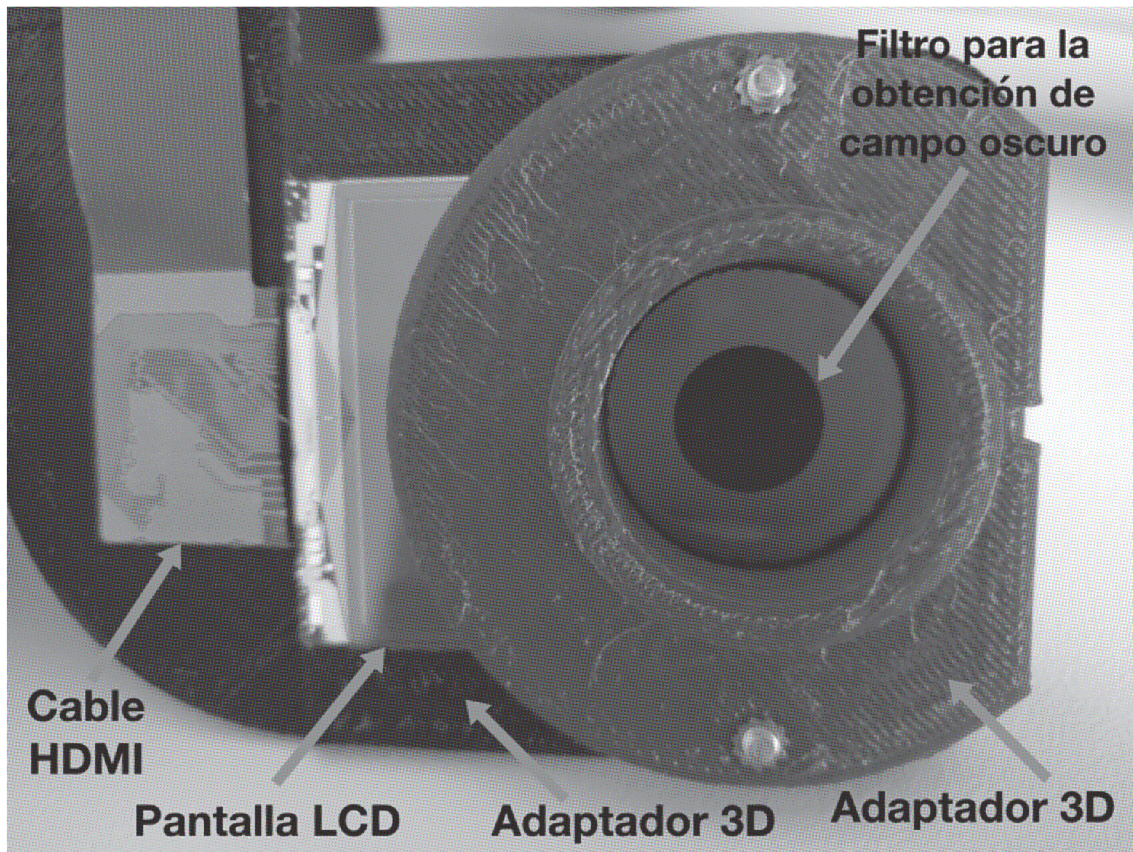


FIG. 5

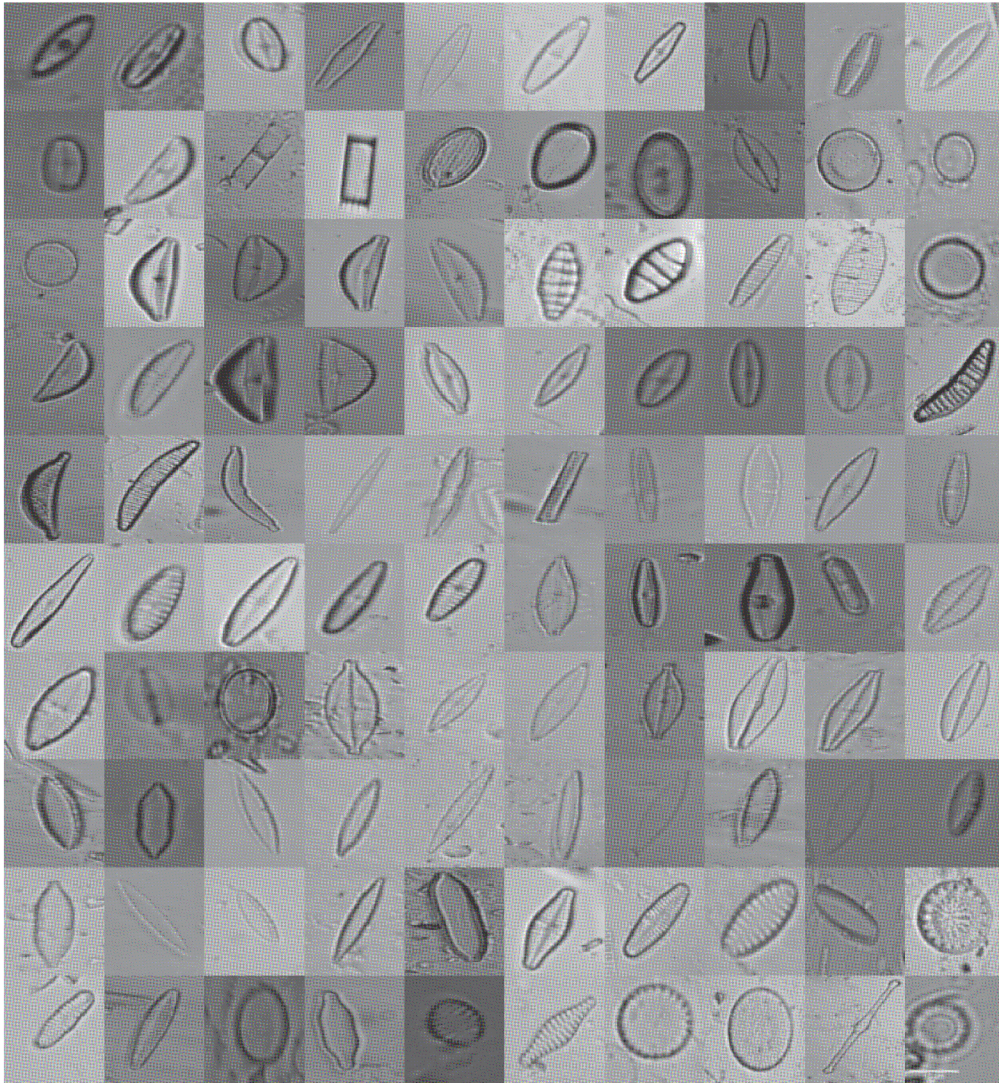


FIG. 6

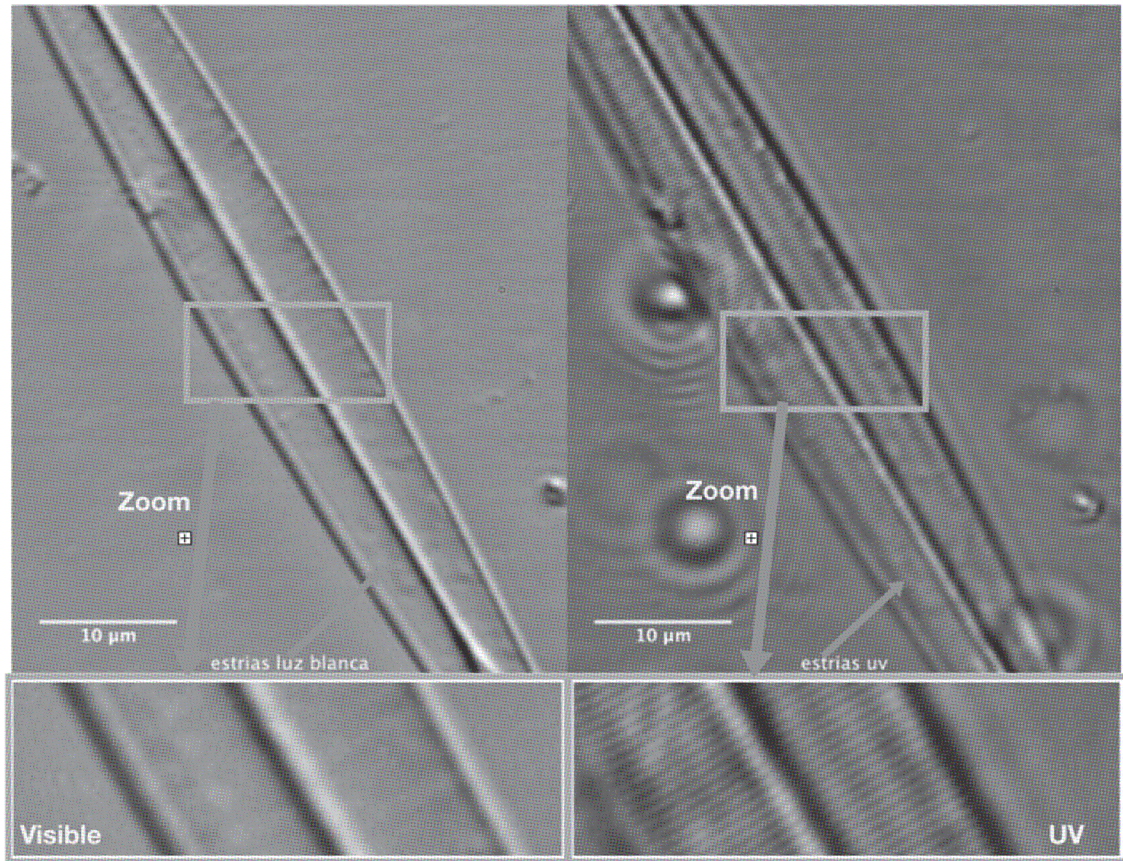


FIG. 7



21 N.º solicitud: 201830982

22 Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **G02B21/08** (2006.01)
G06T7/60 (2017.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 105403988 A (UNIV NANJING SCIENCE & TECH) 16/03/2016, Resumen; párrafos [0002]-[0004], [0006]-[0009], [0023], [0027]-[0029]; figuras.	1, 2, 4
Y		3
A	WO 2018/060806 A1 (FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA) 05/04/2018, resumen;	1, 2
Y	Página 1, línea 6 - página 4, línea 26; figura 1.	3
X	BUENO, G. et al.: "Automated Diatom Classification (Part A): Handcrafted Feature Approaches". APPL. SCI., 25/07/2017, Vol. 7, Páginas 1-22 [en línea][recuperado el 08/10/2019], ver páginas 3, 12 y 13.	5
A	EP 3367151 A1 (NIKON CORPORATION) 29/08/2018, Todo el documento.	1, 2, 4
A	BLANCO, S. et al. "Réponses de la communauté de diatomées épiphytes aux changements expérimentaux du réseau trophique dans un lac peu profond (Espagne)". Actes du 12ème colloque de l'ADLaP, Nantes, 10-15 septembre 2002, 21/05/2014, Páginas 288-303 [en línea][recuperado el 08/10/2019].	-

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la
misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación
de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha
de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.10.2019

Examinador
Ó. González Peñalba

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G02B, G06T, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INSPEC