

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 373**

51 Int. Cl.:

G01N 21/47 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2013 PCT/EP2013/072530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013 E 13783910 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020 EP 2912436**

54 Título: **Procedimiento de observación de especies biológicas**

30 Prioridad:

29.10.2012 FR 1260301

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

26.07.2021

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)
25, Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"
75015 Paris, FR y
BIOMERIEUX (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DUPOY, MATHIEU;
DEBOURDEAU, MATHIEU y
PINSTON, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 845 373 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

Procedimiento de observación de especies biológicas

La invención se refiere a un procedimiento de observación y según el caso de detección de especies biológicas sobre un medio de cultivo contenido en un recipiente tal como una placa de Petri.

5 Los microorganismos tales como la bacterias generalmente se cultivan en un medio de cultivo (agar) contenido en una placa de Petri. Las placas de Petri son cajas cilíndricas poco profundas, constituidas por una base y una tapa, fabricadas en material transparente tal como el vidrio o una materia plástica (poliestireno). La detección de los microorganismos generalmente se hace por observación a simple vista bajo una iluminación uniforme; las colonias bacterianas aparecen en general en forma de montones de materia más o menos abombados, que se pueden ver a través de las paredes o del fondo de la placa de Petri.

10 El documento EP2184346-A2 divulga un método de tratamiento de imágenes del fondo de una placa de Petri invertida. Un haz de láser ilumina el cultivo en la placa en un ángulo con respecto a la cara de la tapa, para inducir una fluorescencia intrínseca en la muestra. Una cámara dispuesta perpendicularmente por debajo de la placa de Petri, captura la imagen de fluorescencia.

15 La observación a través de la tapa generalmente se hace difícil o imposible por la fina capa de vaho, formada por las gotitas difusoras de diámetro comprendido entre 1 µm y 1 mm aproximadamente, que recubre la superficie interior de la tapa. Así, cuando el medio de cultivo es difusor o absorbente (caso del agar sangre) es necesario abrir la placa de Petri para observar los microorganismos cultivados; pero esto conlleva un riesgo de contaminación.

20 La invención tiene como objetivo resolver este problema. Más particularmente, tiene como objetivo proporcionar un procedimiento que permita observar las especies biológicas en un medio de cultivo contenido en un recipiente a través de un cara translúcida (y por lo tanto difusora) de este último, pudiendo hacerse translúcida la cara debido a un depósito de materia difusora, en particular de vaho, sobre ella.

25 Según la invención, este objetivo se alcanza por un procedimiento de observación de especies biológicas sobre un medio de cultivo contenido en un recipiente que presenta al menos una cara translúcida, comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:

a) dirigir un haz de luz sobre una porción de dicha cara translúcida, de forma que se defina al menos una región iluminada y al menos una región no iluminada de dicha cara; y

30 b) adquirir una imagen de una porción de la superficie de dicho medio de cultivo iluminada por dicho haz de luz, siendo realizada la adquisición a través de la dicha o al menos una dicha región no iluminada de dicha cara translúcida y según un eje óptico de adquisición que forma un ángulo distinto de cero con la dirección de propagación de dicho haz de luz.

Ventajosamente, las etapas a) y b) se pueden realizar varias veces definiendo las regiones diferentes iluminadas y no iluminadas de dicha cara translúcida, comprendiendo también el procedimiento una etapa c) de combinación de las imágenes así adquiridas para formar una imagen denominada combinada.

35 En particular, las etapas a) y b) se pueden realizar varias veces, barriendo entonces el haz la superficie del medio de cultivo. En cada posición sucesiva del haz, se adquiere una imagen, siendo tratadas dichas imágenes a continuación para formar una imagen combinada. La imagen combinada constituye entonces una representación del medio de cultivo.

40 Por ejemplo, dicha imagen combinada se puede obtener asociando en cada punto de la superficie del medio de cultivo la intensidad luminosa más débil medida, en correspondencia con dicho punto, sobre dichas imágenes adquiridas.

La imagen combinada mencionada se puede obtener también identificando una región de interés sobre cada una de las imágenes adquiridas, siendo asociadas a continuación dichas regiones de interés para formar la imagen combinada.

45 En particular, la región de interés puede comprender la proyección del haz de luz sobre el medio de cultivo. Por ejemplo, la región de interés puede corresponder a la proyección del haz de luz sobre el medio de cultivo. Preferiblemente, dicha región de interés no comprende la proyección del haz de luz sobre la cara translúcida.

A continuación de las etapas a) y b) mencionadas antes, se puede extraer una zona de interés de la imagen, que incluye la proyección del haz de luz sobre el medio de cultivo. Preferiblemente, esta zona de interés extraída no comprende la proyección del haz de luz sobre la cara translúcida del recipiente.

50 El procedimiento puede comprender también una etapa d) que consiste en detectar dichas especies biológicas por discriminación, sobre dicha imagen o imagen combinada, de regiones claras u oscuras. Esta detección puede ser realizada por un operador, o bien de manera automática por un ordenador que ejecuta un software de tratamiento de

imágenes. Esta detección puede ir acompañada de un recuento de las colonias, así como de su clasificación según un criterio dado, por ejemplo su superficie.

5 Ventajosamente, dicho eje óptico de adquisición puede formar un ángulo de al menos 10° , y preferiblemente comprendido entre 30° y 60° , con dicha cara translúcida y según un eje óptico de adquisición que forma un ángulo con la dirección de propagación de dicho haz de luz.

Dicho haz de luz puede definir en particular, sobre dicha cara translúcida, una región iluminada en forma de línea.

Según un primer modo de realización de la invención, dicho eje óptico de adquisición no coincide con la dirección de reflexión especular de dicho haz de luz por dicho medio de cultivo, por lo cual dichas especies biológicas aparecen sobre dicha imagen como regiones claras.

10 Según un segundo modo de realización de la invención, dicho eje óptico de adquisición coincide sustancialmente con la dirección de reflexión especular de dicho haz de luz por dicho medio de cultivo, por lo cual dichas especies biológicas aparecen sobre dicha imagen como regiones oscuras.

15 Dicha cara se puede volver translúcida mediante un depósito de materia difusora, en particular de gotitas de vaho. Más particularmente, dicho recipiente puede ser una caja, en particular una placa de Petri y dicha cara translúcida es una tapa de dicha caja, cuya superficie interior está recubierta de vaho.

De una forma más general, la cara translúcida está dispuesta enfrente de las especies biológicas. Preferiblemente, la cara translúcida no está en contacto con dichas especies biológicas.

Otras características, detalles y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción hecha con referencia a los dibujos adjuntos a título de ejemplo, en los cuales:

- 20 - la figura 1 muestra una placa de Petri que presenta un capa de vaho sobre la superficie interior de su tapa, que ilustra el problema resuelto por la invención;
- las figuras 2A - 2C representan esquemáticamente la implementación de un procedimiento según un modo de realización de la invención;
- las figuras 3A - 3D ilustran el resultado técnico de la invención, aplicada a la detección de colonias bacterianas;
- 25 - la figura 4 ilustra el resultado técnico de la invención, aplicada a la detección de mohos sobre un medio de cultivo en una placa de Petri;
- las figuras 5A - 5C ilustran la implementación de un procedimiento según un modo de realización alternativo de la invención; y
- 30 - las figuras 6A y 6B permiten comparar una imagen obtenida en condiciones de reflexión especular (6A) y una imagen obtenida fuera de condiciones de reflexión especular (6B).

35 La figura 1 muestra una vista transversal de una placa de Petri BP cerrada de manera estanca por una tapa CP, cuya superficie interior está cubierta con una fina capa de vaho BU; aunque la tapa CP es por sí misma transparente, se vuelve translúcida por la difusión provocada por las gotitas de agua que constituyen la capa de vaho. La placa de Petri está parcialmente llena con un medio de cultivo MC de tipo agar, eventualmente opaco o difusor, sobre el cual se cultivan las colonias bacterianas CB. Como se ha explicado antes, por una parte, el vaho BU impide la observación de las colonias CB a través de la tapa, por otra parte levantar la tapa crearía un riesgo de contaminación del medio de cultivo o del ambiente exterior de la placa de Petri.

40 Este problema se puede resolver, según la invención, de la manera ilustrada en la figura 2A. Una fuente de luz SL (por ejemplo un láser con una longitud de onda de 532 nm) emite un haz de luz FL que es formateado por un sistema óptico. El haz formateado es dirigido oblicuamente hacia la tapa CP, de tal modo que su intersección con dicha tapa define un motivo de iluminación M1 en forma de línea, que presenta una longitud al menos diez veces superior a su anchura que es del orden de 1 mm o menos. La referencia M2 indica el motivo definido sobre la superficie del medio de cultivo MC. Se indica por M0 la parte de la tapa que no está iluminada (y por lo tanto exterior a M1). Una cámara CA, orientada según la normal a la superficie de la tapa - y que forma por lo tanto un ángulo $\alpha \neq 0^\circ$ con el haz de luz de iluminación - adquiere una imagen de la tapa CP (figura 2B).

45 Dado que la dirección de propagación del haz FL y la dirección de observación de la cámara (es decir, su eje óptico de adquisición de las imágenes) forman un ángulo distinto de cero, la cámara observa la región iluminada del medio de cultivo (motivo M2) a través de una parte no iluminada de la tapa (M0). Las colonias bacterianas CB aparecen como puntos brillantes superpuestos en el motivo M2, debido a su carácter difusor. La figura 2C muestra una imagen adquirida por la cámara CA: se puede observar el motivo M1 en la forma de una línea brillante, el motivo M2 en la forma de una línea mucho menos brillante, y dos puntos más luminosos que corresponden a las colonias bacterianas. En efecto:

50

- el medio de cultivo refleja la luz incidente de manera esencialmente especular, pero esta reflexión no es interceptada por la cámara; sólo la luz dispersada por las irregularidades de su superficie, o por el vaho BU, es detectada;
- las colonias bacterianas constituyen precisamente las irregularidades de la superficie del medio de cultivo: por esta razón, aparecen más luminosas;
- la capa de vaho es muy difusora, lo que explica el brillo del motivo M1.

La placa de Petri se monta de forma ventajosa sobre una platina de traslación, lo que permite realizar un barrido de la superficie del medio de cultivo y reconstituir una imagen completa poniendo de manifiesto las colonias bacterianas. Estas últimas pueden ser detectadas a continuación por un operador o bien de manera automática por medio de un procedimiento de tratamiento de imágenes conocido por sí mismo, por ejemplo, utilizando un valor de umbral, un filtro de paso alto, o una detección de contornos, ejecutado por un ordenador programado de manera oportuna y conectado a la cámara CA.

Para obtener la imagen completa, se puede extraer, sobre cada imagen adquirida, una región de interés, que corresponde a la proyección del haz sobre el medio de cultivo. La anchura de una región de interés es preferiblemente igual al paso de traslación entre dos posiciones sucesivas de la placa de Petri. Entre dos imágenes adquiridas sucesivamente, la región de interés es desplazada por una distancia correspondiente al paso de desplazamiento de la platina. Las regiones de interés extraídas en el transcurso del barrido se combinan a continuación para formar la imagen completa.

El efecto técnico de la invención se ilustra en las figuras 3A a 3D, que se relaciona con el caso de un cultivo de *Escherichia Coli* a las 24 horas de cultivo en agar sangre (Gelosa Columbia + 5 % de sangre de carnero - referencia Biomérieux 43041). El ángulo α es igual a 42° , siendo realizada la iluminación por una fuente láser, que proyecta una línea de 1 mm de anchura sobre el medio de cultivo. La figura 3A ha sido adquirida a través de la tapa, iluminada de manera uniforme: no se ve más que la luz retrodispersada por el vaho y no se distinguen en absoluto las colonias bacterianas. Estas últimas por el contrario son claramente visibles no solo en la figura 3B, adquirida después de haber quitado la tapa, sino también en la figura 3C obtenida a través de la tapa por el método descrito antes. La figura 3D corresponde a un superposición de las figuras 3B y 3C, que permite verificar su muy buena correlación.

La invención no se limita a la observación de colonias bacterianas; a título de ejemplo la figura 4 muestra una imagen obtenida por un método tal como el descrito antes aplicado a la observación de un medio de cultivo sembrado con un moho (*Aspergillus Fumigatus*).

La invención admite numerosas variantes:

- El recipiente puede no ser una placa de Petri, y la observación puede no realizarse a través de una tapa que presenta una superficie cubierta de vaho; lo que cuenta es que un medio de cultivo contenido en un recipiente sea observado a través de una cara de dicho recipiente que se ha vuelto translúcida (difusora) por un depósito de materia difusora, por ejemplo el vaho o la grasa (huellas dactilares) con el fin de detectar especies biológicas.
- La iluminación se puede realizar con luz monocromática, o policromática, incluso blanca, espacialmente coherente o incoherente.
- Se pueden utilizar varias fuentes de luz: láser, lámpara, diodo electroluminiscente, haz de fibras ópticas, etc.
- El haz de luz puede ser paralelo (colimado), convergente o divergente.
- El motivo M1 no debe ser necesariamente en forma de línea. Sin embargo, es esencial que el haz de luz defina al menos una región iluminada y una región no iluminada de la tapa de la placa de Petri (más en general: de la cara translúcida del recipiente).
- No es esencial que el haz sea dirigido oblicuamente sobre la tapa (más en general: la cara translúcida) y que la dirección de observación sea normal a dicha tapa; lo contrario podría ser correcto, o entonces tanto la dirección de iluminación como la de observación podrían ser oblicuas. Lo que es importante es que una región iluminada del medio de cultivo (M2) pueda ser observada a través de una región no iluminada (M0) de la tapa. Por eso, es necesario que el ángulo α formado por la dirección de iluminación y la de observación no sea cero y preferiblemente que sea superior o igual a 10° .
- Un caso particular merece ser señalado. Cuando la dirección de iluminación y la dirección de observación forman un mismo ángulo con la superficie del medio de cultivo, es decir, se encuentran en condiciones de reflexión especular, el motivo M2 aparece brillante y las especies biológicas constituyen manchas oscuras. Esta situación está ilustrada en la figura 6A, donde aparecen tres colonias como interrupciones de una línea de iluminación. La figura 6B muestra esas mismas colonias que aparecen como manchas luminosas cuando el medio de cultivo es observado fuera de condiciones de reflexión especular.

5 A título de ejemplo, las figuras 5A a 5C ilustran un modo de realización alternativo de la invención. La iluminación se realiza con luz blanca. y el motivo M1 (figura 5A) se presenta en la forma de cuatro bandas luminosas. Se adquieren tres imágenes desplazando una placa de Petri con respecto a este motivo (lo que se puede lograr desplazando la placa, como en el caso de la figura 2A, o bien el motivo) como se ilustra en la figura 5B; después las partes oscuras de estas imágenes se combinan entre ellas para dar una imagen final, reproducida en la figura 5C. En otras palabras, se extrae, en cada imagen, una región de interés que comprende el rastro del haz de luz en el medio de cultivo, siendo combinadas las diferentes zonas de interés para formar la imagen final.

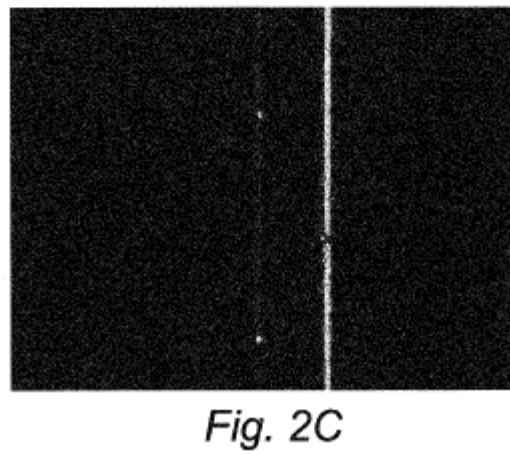
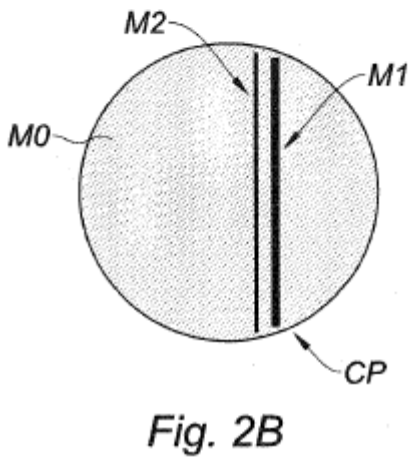
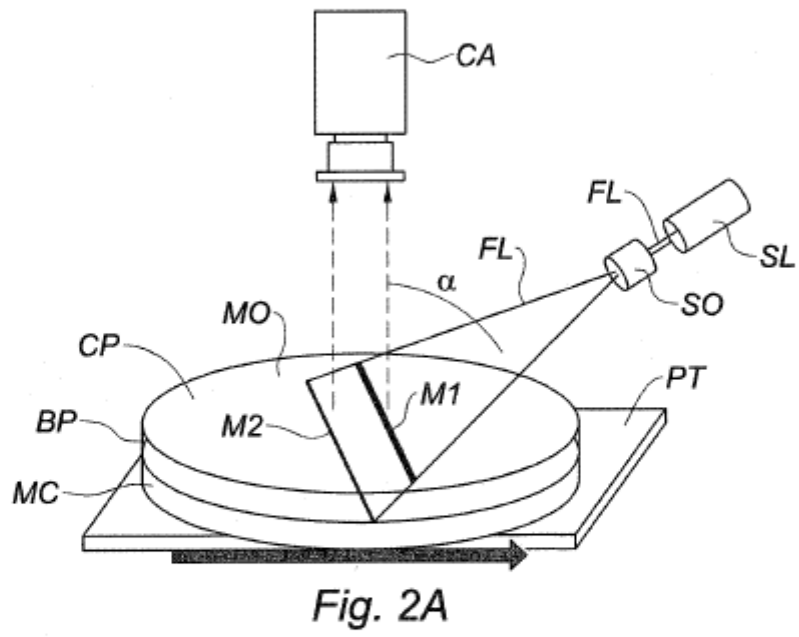
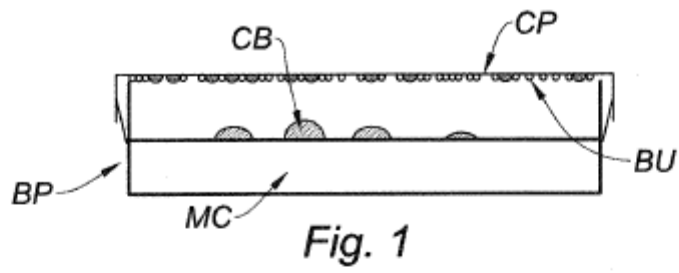
La imagen 5C se puede construir píxel a píxel de la siguiente manera: para cada punto de la tapa se toma la intensidad luminosa medida más baja, en correspondencia con dicho punto, sobre las diferentes imágenes adquiridas.

10 En otros términos, sea $I_n(x,y)$ la intensidad luminosa de la imagen número n ($n = 1 - 3$ en el ejemplo de las figuras 5A - 5C) en función de la posición (x,y) . Entonces, la imagen combinada IC se forma aplicando, en cada punto (x,y) la relación: $IC(x, y) = \min_n (I_n(x,y))$. Esto vuelve a enmascarar el rastro del haz de luz FL sobre la cara translúcida del recipiente, presentándose esta última bajo la forma de una zona de intensidad elevada.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de observación de especies biológicas (CB) sobre un medio de cultivo (MC) contenido en un recipiente que presenta al menos una cara translúcida (CP, BU), comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:
- 5 a) dirigir un haz de luz (FL) sobre una porción de dicha cara translúcida, de forma que se defina al menos una región iluminada (M1) y al menos una región no iluminada (M0) de dicha cara; y
- b) adquirir una imagen de una porción (M2) de la superficie de dicho medio de cultivo iluminada por dicho haz de luz, siendo realizada la adquisición a través de la dicha o al menos una dicha región no iluminada (M0) de dicha cara translúcida y según un eje óptico de adquisición que forma un ángulo distinto de cero (α) con la
- 10 dirección de propagación de dicho haz de luz.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas a) y b) se realizan varias veces definiendo las regiones diferentes iluminadas y no iluminadas de dicha cara translúcida, comprendiendo también el procedimiento una etapa c) de combinación de las imágenes así adquiridas para formar una imagen denominada combinada.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha imagen combinada se obtiene asociando en cada punto de la superficie del medio de cultivo la intensidad luminosa medida más baja, en correspondencia con dicho punto, sobre dichas imágenes adquiridas.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha imagen combinada se obtiene definiendo una región de interés de cada imagen adquirida, siendo asociadas a continuación dichas regiones de interés para formar la imagen combinada.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende también una etapa d) que consiste en detectar dichas especies biológicas por discriminación, sobre dicha imagen o imagen combinada, de regiones claras u oscuras.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho eje óptico de adquisición forma un ángulo (α) de al menos 10° , y preferiblemente comprendido entre 30° y 60° , con dicha cara translúcida y según un eje
- 25 óptico de adquisición que forma un ángulo con la dirección de propagación de dicho haz de luz.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho haz de luz define, sobre dicha cara translúcida, una región iluminada (M1) en forma de línea.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho eje óptico de adquisición no coincide con la dirección de reflexión especular de dicho haz de luz por dicho medio de cultivo, por lo cual dichas especies biológicas aparecen en dicha imagen como regiones claras.
- 30 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho eje óptico de adquisición coincide sustancialmente con la dirección de reflexión especular de dicho haz de luz por dicho medio de cultivo, por lo cual dichas especies biológicas aparecen sobre dicha imagen como regiones oscuras.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha cara se vuelve translúcida por un depósito de materia difusora, en particular de gotitas de vaho (BU).
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho recipiente es una placa de Petri (BP) y dicha cara translúcida es una tapa (CP) de dicha placa, cuya superficie interior está recubierta de vaho (BU).



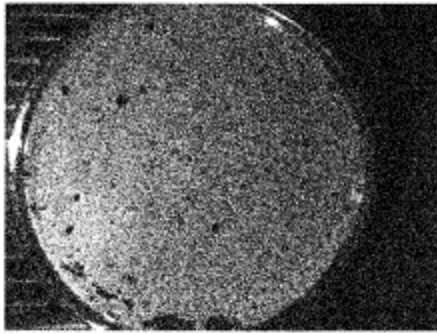


Fig. 3A

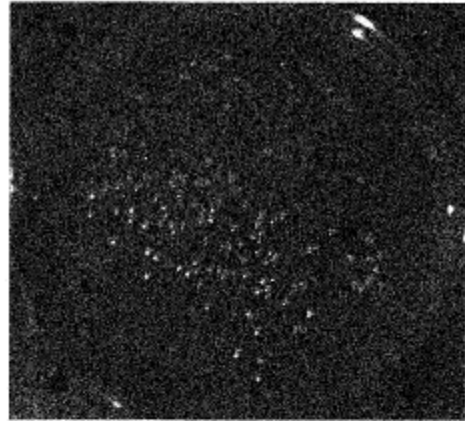


Fig. 3B

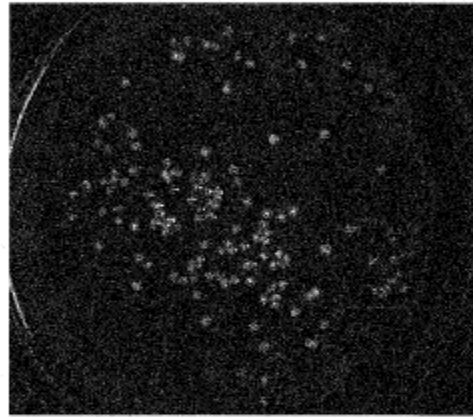


Fig. 3C

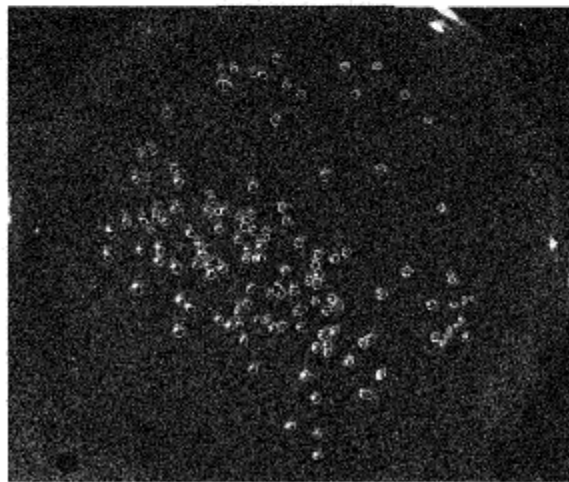


Fig. 3D

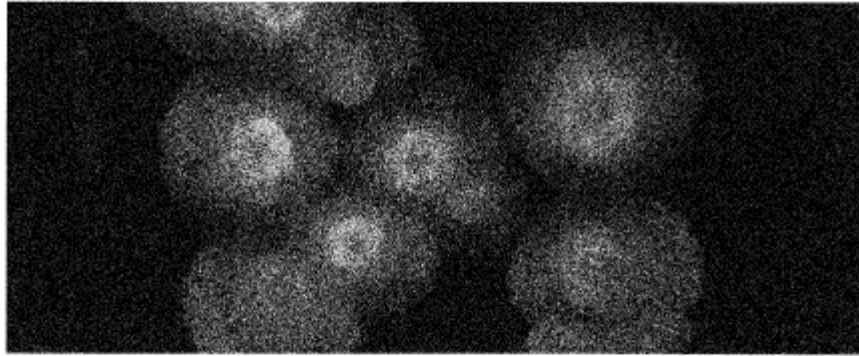


Fig. 4

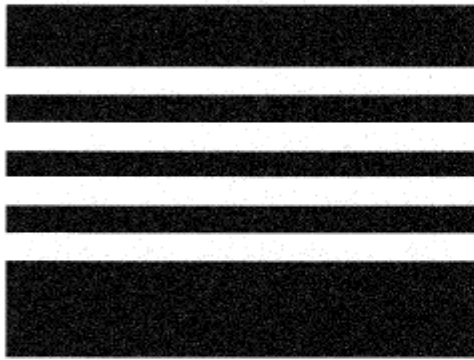


Fig. 5A

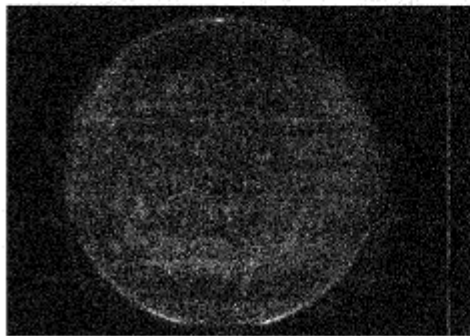


Fig. 5C

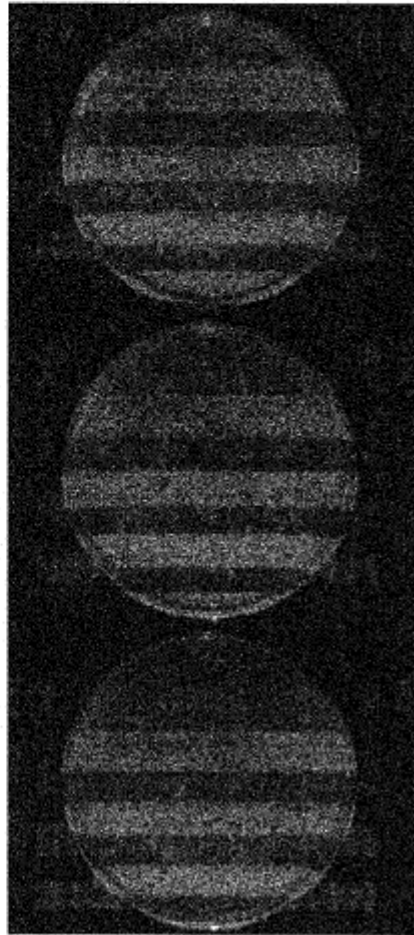


Fig. 5B

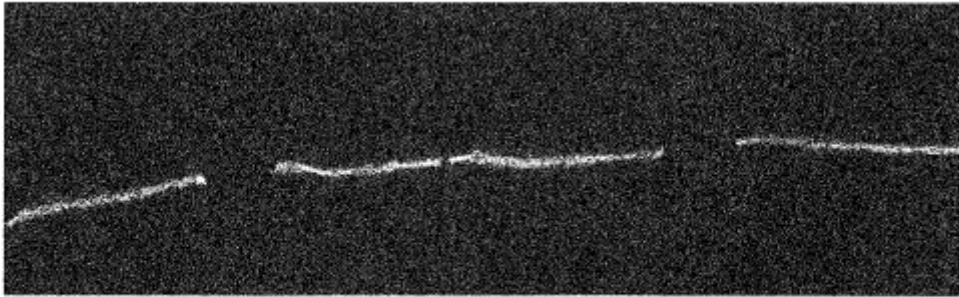


Fig. 6A



Fig. 6B