Método de cuantificación automática de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus Dengue por medio de visión artificial

Geraldine Ardila Patiño y Andrés Felipe Farfán Pinilla

Universidad El Bosque
Facultad de Ingeniería
Programa de Bioingeniería
Bogotá D.C
2020

Método de cuantificación automática de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus Dengue por medio de visión artificial

Geraldine Ardila Patiño y Andrés Felipe Farfán Pinilla

Trabajo de grado para optar por el título de Bioingeniero de la Universidad El Bosque

Modalidad de trabajo de grado : Investigación
Director: Félix Giovanni Delgado Tiria
Codirector: Jonathan Avendaño Pérez

Universidad El Bosque
Facultad de Ingeniería
Programa de Bioingeniería
Bogotá D.C
2020

Nota de aceptación:

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Tutor de Trabajo de Grado

_____

Cotutor de Trabajo de Grado

_____

Jurado

_____

Jurado

,

Dedico este trabajo de grado a mi abuelita quien me dio los mejores momentos de mi infancia y ahora me acompaña a finalizar esta etapa de mi vida desde el cielo.

Geraldine Ardila.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por iluminarme y permitirme culminar este proceso tan importante en mi vida.

A mis papás por creer en mí y en mis expectativas a lo largo de la carrera, por acompañarme en cada trasnochada y darme ánimos cuando me sentía cansada, por escucharme practicar antes de cada sustentación. Su apoyo fue mi principal inspiración para seguir adelante con este camino de ser Bioingeniera.

A mi hermana por ser mi compañera de vida, a mis tutores por ayudarnos y brindarnos su conocimiento en cada paso de este proyecto.

Finalmente, a mi compañero de trabajo de grado por su paciencia, compañía y trabajo en equipo en estos cuatro años y medio de formación como profesionales.

Geraldine Ardila.

Agradezco primeramente a Dios y a la vida por darme esta oportunidad tan grande y permitirme terminarla satisfactoriamente.

A mis padres por ser ese apoyo incondicional tanto en momentos buenos, como en momentos malos durante todo este tiempo de formación, haciéndome crecer tanto como persona, como profesional sacando a flote lo mejor de mí para conseguir este gran logro de ser Bioingeniero.

A mis compañeros de semestre por hacer de estos años experiencias inolvidables con grandes enseñanzas cada día. Por ultimo a mi compañera de trabajo de grado por toda la paciencia, las risas, las trasnochadas terminando trabajos y todo el trabajo en equipo durante todo este tiempo de formación profesional.

Andrés Felipe Farfán.

CONTENIDO

pág.

DEDICATORIA 4

AGRADECIMIENTOS 5

ABREVIATURAS 16

RESUMEN 17

INTRODUCCIÓN 18

1.. **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA** 20

2.. **JUSTIFICACIÓN** 22

3.. **OBJETIVOS** 24

3.1. Objetivo General 24

3.2. Objetivos Específicos 24

4.. **MARCO REFERENCIAL** 25

4.1. **Marco Teórico** 25

4.1.1. Virus del Dengue 25

4.1.1.1. Características del virus 25

4.1.1.2. Enfermedad 27

4.1.1.3. Dengue en Colombia 28

4.1.1.4. Anticuerpos generados por infección del Dengue 30

4.1.2. Métodos de identificación de anticuerpos neutralizantes 32

4.1.2.1. Técnica de neutralización por reducción del número de placas (PRNT) 32

4.1.2.2. Cuantificación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) por medio de PRNT 32

4.1.2.3. Citometría de flujo 33

4.1.2.4. Cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes (NAbs) por medio de citometría de flujo 34

4.1.3. Métodos de conteo de células alternos 35
4.1.3.1. Microscopía de fluorescencia 35
4.1.3.2. Cámara de Neubauer 36
4.1.3.3. Sustrato cromogénico 37
4.1.4. Procesamiento de imágenes 38
4.1.4.1. Adquisición de la imagen 39
4.1.4.1.1. Imagen digital 39
4.1.4.1.2. Vecindad 39
4.1.4.2. Pre-procesamiento de la imagen 40
4.1.4.3. Segmentación 40
4.1.4.3.1. Segmentación por umbralización: Otsu 40
4.1.4.4. Watershed 41
4.1.4.5. Extracción de características 41
4.1.4.5.1. Morfológicas 41
4.1.4.5.2. Modelos de color 42
4.1.4.6. Selección de características 44
4.1.4.6.1. Análisis de componentes principales (PCA) 45
4.1.4.6.2. Eliminación de características recursivas (RFE) 45
4.1.4.6.3. Búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS) 46
4.1.4.7. Modelos de predicción y clasificación 46
4.1.4.7.1. Máquina de soporte vectorial (SVM) 46
4.1.4.7.2. Bosques Aleatorios (RF) 47
4.1.4.7.3. Red Neuronal (NN) 47
4.1.4.7.4. Regresión logística (LG) 49
4.1.4.8. Índices de evaluación de desempeño 49
4.1.4.8.1. Matriz de confusión 49
4.1.4.8.2. F1-Score 50
4.1.4.8.3. Matriz de correlación 50

4.1.4.8.4. ROC 50

4.2. **Estado del Arte** 50

4.2.1. Algoritmos realizados para cuantificación de células. 50

4.2.2. Estudios sobre Prototipos como alternativas a citometría de flujo. 53

4.2.3. Estudios sobre comparación entre método PRNT vs Citometría de flujo para determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes. 55

5.. **LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS** 57

5.1. Funcionales 57

5.2. Técnicos 57

5.3. Restricción 58

5.4. Calidad 58

6.. **METODOLOGÍA** 60

6.1. Construcción de conjunto de imágenes sintéticas. 60

6.2. Cuantificación de células infectadas y no infectadas en imágenes. 64

6.3. Cálculo de título de neutralización 50. 67

6.4. Evaluación del método propuesto. 68

6.5. Diseño detallado del prototipo. 68

7.. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN** 72

7.0.1. Búsqueda de datasets en banco de imágenes 72

7.1. Construcción de conjunto de imágenes sintéticas. 72

7.2. Cuantificación de células infectadas y no infectadas con DENV en imágenes. 77

7.2.1. Pre-procesamiento y segmentación de la imagen 77

7.2.2. Selección de características 81

7.2.2.1. Análisis de linealidad de las características 81

7.2.2.2. Técnicas de selección de características 82

7.2.3. Selección de modelos de clasificación 85

7.3. Cálculo de título de neutralización 50. 87

7.4. Evaluación del método propuesto. 93

7.4.1. Evaluación del método de clasificación propuesto. 93

7.4.2. Evaluación del método al calcular NEUT50. 94

7.4.3. Evaluación del método cuantificar células en imágenes. 96

7.5. Diseño detallado del prototipo. 99

7.5.1. Diseño experimental de pruebas de cámara microscópica 106

8.. **CONCLUSIONES** 111

9.. **RECOMENDACIONES** 112

10..**BIBLIOGRAFÍA** 113

11..**ANEXOS** 123

LISTA DE FIGURAS

pág.

1.1. Árbol de problema. Fuente: Elaboración propia. 21

2.2. Casos de dengue en Colombia semanas epidemiológicas 1 a 39 del 2019. Fuente: INS, 2019. 22

2.3. Identificación de serotipos del virus dengue en los departamentos priorizados de Colombia en 2019. Fuente: INS, Entomología, 2019. 22

4.4. Transmisión e interacción entre virus y vector. Fuente: Fuentes, 2016. 25

4.5. Estructura viral del DENV. Fuente: Laredo, Guo & Bocanegra, 2012. 26

4.6. Proteoma estructural del virus del dengue. (Se muestran para los dominios de la estructura de la proteína C, prM, E, NS3 y NS5. Las estructuras actualmente no están disponibles para las proteínas denotadas en rojo. Fuente: Perera & Kuhn, 2008. 26

4.7. Clasificación clínica del dengue.Fuente: OPS, 2010. 28

4.8. Casos de dengue en Colombia semanas epidemiológicas 1 a 39 del 2019. Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2019 29

4.9. Identificación de serotipos del virus dengue en los departamentos priorizados de Colombia en 2019. Fuente: Instituto Nacional de la Salud. Entomología, 2019. 29

4.10. Partes de un anticuerpo. Fuente: Padial, 2018. 30

4.11. Zonas de unión antígeno-anticuerpo. Fuente: Rockland Immunochemicals Inc, 2019. 30

4.12. Actividad de anticuerpos neutralizantes contra el virus DENV-1. Fuente: Kaiser, 2019. 31

4.13. Resultado ensayo PRNT. Fuente: Liljander et al., 2016. 33

4.14. Funcionamiento de Citómetro de flujo. Fuente: Barrera, 2004. 33

4.15. Curva sigmoidal de dosis-respuesta. Fuente: de Alwis & de Silva, 2014. 35

4.16. La microscopía de fluorescencia se puede usar para cuantificar el porcentaje de células infectadas.(Verde: células infectadas por el virus Zika; Azul: núcleos celulares). Fuente: Thenativeantigencompany.com, 2019 36

4.17. Cámara de Neubauer de dos rejillas y diez rejillas. Fuente: Bustillo, 2010 36

4.18. Fotografía con resolución de 400 pp de muestra de eritrocitos (De tamaño de 6 a 8 μm en cámara de Neubauer). Fuente: Muñóz, 2012. 37

4.19. Identificación de células infectadas con Dengue a partir de sustrato cromogénico. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque. 38

4.20. Identificación de células infectadas con Dengue a partir de sustrato cromogénico. Fuente:Ungaro, Abreu & Fukata, 2009. 38

4.21. Fases generales del procesamiento digital de imágenes.Fuente: Elaboración propia. 39

4.22. Vecindad de píxel con vecindad de 4 píxeles y con vecindad de 8 píxeles. Fuente: Viera, 2017. 40

4.23. Técnica de histograma para contraste (izquierda) y Otsu (derecha). Fuente: Bustamante, 2019. 41

4.24. Técnica watershed utilizada en globos rojos. Fuente:González, Rodríguez & Orozco, 2017. 41

4.25. Tetraedro de color RGB. Fuente: Olanchea, 2015. 42

4.26. Representación gráfica de modelo HVS. Fuente: Morais, 2015. 42

4.27. Representación gráfica de modelo YCrCb. Fuente: Kolkuret al., 2017. 43

4.28. Conversión de RGB a YCrCb. Fuente: Kolkuret al., 2017. 43

4.29. Representación gráfica de modelo XYZ. Fuente: Ibraheem, 2012. 43

4.30. Conversión de RGB a XYZ. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017. 44

4.31. Representación gráfica de modelo LUV. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017. 44

4.32. Representación gráfica de modelo LAB. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017. 44

4.33. Psecudocódigo de RFE. Fuente: Granitto, Furlanello, Biasioli & Gasperi, 2006 45

4.34. Representación gráfica de SVM. Fuente: https://cutt.ly/dgKaxkr 47

4.35. Representación gráfica de Random Forest. Fuente: https://cutt.ly/pgK3zBu 47

4.36. Modelo de red neuronal. Fuente: https://cutt.ly/5gKaGVI 48

4.37. Diagrama de flujo del dispositivo diseñado para cuantificación automática de placas en PRNT. Fuente: Asthana et al., 2018. 53

4.38. Configuración experimental del dispositivo. a.Esquemático del sistema de imágenes de sombras sin lentes. b.Vista externa del dispositivo. c. Vista interna del dispositivo. d. Fotografía e instantánea de la aplicación de teléfono que realiza el recuento de células sanguíneas. Fuente: Roy et al.,2014. 54

4.39. Gráficos de dispersión de los valores de PRNT 50 y FNT 50. Fuente: Frumence, Viranaicken, Gadea & Desprès, 2019. 56

6.40. Etapas de proyecto de grado. Fuente: Elaboración propia. 60

6.41. Metodología de búsqueda de dataset en bancos de imágenes. Fuente: Elaboración propia. 60

6.42. Imagen seleccionada para editar. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque. 61

6.43. Imágenes de células infectadas. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque. 61

6.44. Técnica de data aumentation para versiones modificadas de células infectadas. Fuente: Elaboración propia. 62

6.45. Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 1). Fuente: Elaboración propia. 62

6.46. Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 2). Fuente: Elaboración propia. 63

6.47. Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 3).Fuente: Elaboración propia. 63

6.48. Cuadros de delimitación de células en imágenes. Fuente: Elaboración propia. 63

6.49. Cuatro píxeles de cuadro que delimita las células. Fuente: Elaboración propia. 64

6.50. Algoritmo de procesamiento de imágenes.Fuente: Elaboración propia 64

6.51. Algoritmo de preprocesamiento y segmentación de imágenes. Fuente: Elaboración propia 65

6.52. Algoritmo extracción de características de imágenes. Fuente: Elaboración propia 65

6.53. Metodología para selección de características discriminantes. Fuente: Elaboración propia. 66

6.54. Metodología para entrenamiento de modelos de clasificación. Fuente: Elaboración propia. 66

6.55. Metodología de diseño detallado de prototipo. Fuente: Elaboración propia. 69

6.56. Metodología final de proyecto. Fuente: Elaboración propia. 70

6.57. Entradas y salidas de objetivos específicos de proyecto. Fuente: Elaboración propia. 71

7.58. Dataset encontrado en banco de imágenes. Fuente:https://imagebank.hematology.org/ 72

7.59. Células transformadas a través de data augmentation 72

7.60. Grupo 1 de dataset. Fuente: Elaboración propia. 75

7.61. Grupo 2 de dataset. Fuente: Elaboración propia. 75

7.62. Grupo 3 de dataset. Fuente: Elaboración propia. 75

7.63. Grupo 4 de dataset. Fuente: Elaboración propia. 76

7.64. Procesamiento de imagen para cuantificación de células. Fuente: Elaboración propia. 76

7.65. Tabla con coordenadas de 4 puntos de células en cada imagen. Fuente: Elaboración propia. 76

7.66. Imagen con dilatación de 15 iteraciones. Fuente: Elaboración propia. 77

7.67. Imagen con erosión de 15 iteraciones. Fuente: Elaboración propia. 78

7.68. Procesamiento de imagen para cuantificación de células. Fuente: Elaboración propia. 79

7.69. Algoritmo del código realizado en Python para procesamiento de imágenes. 80

7.70. Conversión de imagen a espacios de color. a. HSV. b. YCrCb. c. LAB. d. LUV. e. GREY. f. XYZ. Fuente: Elaboración propia. 80

7.71. Diferencia entre células infectadas y no infectadas en los diferentes espacios de color. Fuente: Elaboración propia. 81

7.72. Matriz de coeficiente de Pearson para las 78 características calculadas. Fuente: Elaboración propia. 82

7.73. Selección de cantidad de características adecuado según método RFE. Fuente: Elaboración propia. 83

7.74. Selección de cantidad de características adecuado según método SFFS. Fuente: Elaboración propia. 83

7.75. Gráfica PCA. Fuente: Elaboración propia. 84

7.76. Gráfica varianza acumulada de componentes en PCA.Fuente: Elaboración propia. 85

7.77. Comparación de rendimiento de modelos. Fuente: Elaboración propia. 86

7.78. Comparación de MSE en modelos. Fuente: Elaboración propia. 86

7.79. Comparación de rendimiento costo/beneficio de modelos. Fuente: Elaboración propia. 87

7.80. Algoritmo del código realizado en Python debe realizó el siguiente procedimiento para hallar el NEUT50. Fuente: Elaboración propia. 88

7.81. Curva sigmoidea hallada a partir de método planteado. Fuente: Elaboración propia. 89

7.82. Comparación de cálculo de X0 real con método propuesto. Fuente: Elaboración propia. 90

7.83. Gráfica de coeficiente de determinación entre valor de NEUT50 hallado con método gold standard y método propuesto en entrenamiento. Fuente: Elaboración propia. 92

7.84. Interfaz de usuario. Fuente: Elaboración propia. 93

7.85. Gráfico comparativo de valor NEUT50 hallado con método de referencia y método propuesto. Fuente: Elaboración propia 94

7.86. Matriz de correlación de valor NEUT50 hallados con método *gold standard* y método propuesto. Fuente: Elaboración propia 95

7.87. Coeficiente de determinación entre valor de NEUT50 hallado con método de referencia y método propuesto en entrenamiento. Fuente: Elaboración propia 96

7.88. Imágenes 1 a 3 utilizadas para la evaluación de la cuantificación por expertos y por método propuesto. Fuente: Elaboración propia 97

7.89. Imágenes 4 a 6 utilizadas para la evaluación de la cuantificación por expertos y por método propuesto. Fuente: Elaboración propia 97

7.90. Comparación entre porcentajes de error humano y del código propuesto. Fuente: Elaboración propia. 99

7.91. Diagrama funcional de prototipo. Fuente: Elaboración propia. 100

7.92. Cámara microscópica. Fuente: https://cutt.ly/vgOOna9 101

7.93. Componentes añadidos a diseño de CNC. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360. 101

7.94. Diseño detallado del prototipo. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360. 102

7.95. Partes de prototipo. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360. 102

7.96. Diseño externo del prototipo. Fuente: Elaboración propia. 103

7.97. Esquemático de conexiones para el encendido del prototipo, movimiento de los motores y control de luz. Fuente: https://bit.ly/35XtxT9 103

7.98. Diagrama de comando de motores para captura de imágenes. Fuente: Elaboración propia. 104

7.99. Movimiento en eje X de cámara. Fuente: Elaboración propia. 104

7.100 Movimiento en eje Z de cámara. Fuente: Elaboración propia. 105

7.101 Movimiento en eje Y de cámara. Fuente: Elaboración propia. 105

7.102 Condiciones de captura de imágenes con cámara microscópica. Fuente: Elaboración propia. 107

7.103 Imágenes de prueba capturadas con cámara microscópica propuesta (En estas imágenes se pueden visualizar núcleos de células U937DC-SIGN no infectadas fijadas y marcadas a una dilusión de 1:5). Fuente : Elaboración propia 108

7.104 Imágenes de prueba capturadas con cámara microscópica propuesta (En estas imágenes se pueden visualizar núcleos de células U937DC-SIGN no infectadas fijadas y marcadas a una dilusión de 1:10). Fuente : Elaboración propia 108

7.105 Imágenes de prueba a portaobjetos milimetrado Fuente: Elaboración propia 108

7.106 Placa milimétrica (Derecha). Placa con células (Izquierda). Fuente: Elaboración propia. 109

7.107 Imagen de placa con células capturada con cámara de teléfono celular de 12 MP y zoom máximo de 5X. Fuente: Elaboración propia. 109

7.108 Funcionamiento del método final planteado. Fuente: Elaboración propia. 110

LISTA DE TABLAS

pág.

6.1. Características de color obtenidas. 66

7.2. Información de grupo 1 agrupo 4 de dataset de imágenes. 73

7.3. Información de 13 muestras de dataset de imágenes. 74

7.4. Variación en iteraciones de dilatación en la imagen vs incidencia en conteo de células. 77

7.5. Variación en iteraciones de erosión en la imagen vs incidencia en conteo de células. 78

7.6. Variación en iteraciones de dilatación y erosión en la imagen vs incidencia en conteo de células. 78

7.7. Índices de evaluación de modelos de clasificación. 86

7.8. Índices de rendimiento costo/beneficio de modelos 87

7.9. Información sobre prueba de donante para hallar NEUT50. Fuente: Grupo de Virología. 89

7.10. Comparación de cálculo de X0 real con método propuesto. 90

7.11. Comparación de cálculo de NEUT50 real con método propuesto. 91

7.12. Matriz de confusión de clasificación de células infectadas y no infectadas en 13 muestras. 93

7.13. Índices de evaluación de método de clasificación de células. 94

7.14. Índices de evaluación del método propuesto al calcular NEUT50. 95

7.15. Cuantificación de 6 imágenes de células por expertos de laboratorio de Virología comparado con valores reales y obtenidos por el método propuesto. Fuente: Elaboración propia 98

7.16. Elección de componentes. 100

7.17. Requerimientos de cámara microscópica. 106

ABREVIATURAS

- **CNC:** Control numérico computarizado.
- **DENV:** Virus dengue.
- **Is:** Infección de muestras experimentales.
- **Ix:** Porcentaje de Infección.
- **I0:** Control de infección negativo.
- **M1:** Cantidad de células no infectadas.
- **M2:** Cantidad de células infectadas.
- **MSE:** Mean squared error (Error cuadrático medio).
- **NAbs:** Anticuerpos neutralizantes.
- **NEUT50:**Título de neutralización 50.
- **NN:**Neural Network (Red Neuronal).
- **Nx:** Porcentaje de neutralización.
- **PRNT:** Técnica de neutralización por reducción del número de placas.
- **PCA:** Principal Component Analysis (Análisis de componentes principales).
- **RF:**Random forest (Bosques aleatorios).
- **RFE:**Recursive Feature Elimination (Eliminación de características recursivas).
- **SFFS:** Sequential floating forward selection (Búsqueda flotante secuencial hacia adelante).
- **SVM:** Support Vector Machines (Máquina de soporte vectorial).

RESUMEN

Actualmente para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes (NAbs) inducidos por infección con virus Dengue, en muestras de suero de individuos donantes de sangre, se realizan dos pruebas: PRNT y Citometría de flujo, las cuales tienen la finalidad de obtener el valor del título de neutralización 50 (NEUT50) para el donante. Sin embargo, al ser pruebas biológicas, requieren de personal experto para realizar el procedimiento, además de equipos, materiales y softwares de alto costo, teniendo en cuenta que en algunas de estas pruebas se debe realizar cuantificación de forma visual incrementando la probabilidad de presentar mayor porcentaje de errores humanos, generando así que el estudio tarde mayor tiempo.

El objetivo de esta investigación es presentar un método alterno de cuantificación automática de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus Dengue por medio de visión de máquina, con el fin de usarse como herramienta de apoyo para el personal del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

El método fue desarrollado en cuatro etapas diferentes, la primera de estas fue desarrollar un dataset sintético (creado a partir de imágenes reales) que simuló diferentes porcentajes de infección celular con virus DENV. Cabe mencionar que las anteriores imágenes fueron otorgadas por el grupo de Virología de la Universidad El Bosque.

Siguiente a esta etapa se presenta una técnica de procesamiento de imágenes para la detección y clasificación automática de células infectadas y no infectadas un las imágenes sintéticas, en la cual el algoritmo emplea técnicas de Otsu y marcación por conectividad para la segmentación y una máquina de soporte vectorial entrenada (SVM) con 10 características de la imagen para la clasificación binaria de las células. La tercera etapa se basó en el desarrollo de un código para la conversión de células infectadas a títulos de anticuerpos neutralizantes y determinación de NEUT50 por medio de la técnica de regresión logística. Por último se diseñó el prototipo de visión de maquina para la adquisición de imágenes de las célula y la interfaz gráfica de usuario para ilustrar valores de NEUT50.

Como resultados del desempeño del método propuesto se obtuvo una exactitud de 0,972 con las 10 características elegidas además de un valor de exactitud de 0,90 % en el modelo de clasificación SVM y una correlación de los valores de NEUT50 con respecto al método empleado en el laboratorio de 0,99, de acuerdo a estos valores puede ser determinado como un método reproducible y repetible por presentar índices de evaluación cercanos a 1.

Se pudo determinar que un prototipo de visión de máquina aplicado al área de investigación, es una herramienta de gran utilidad que permite apoyar el trabajo manual y visual en el laboratorio para la persona que realice las pruebas de cuantificación de NAbs. Además de que puede realizar la cuantificación automática de células, lo que evita el sesgo por parte de un profesional, y por medio de un software libre a través de una regresión logística permite desarrollar todos los cálculos que se llevan a cabo para hallar el valor de NEUT 50.

Palabras clave: Anticuerpos neutralizantes, cuantificación automática, dengue, visión de máquina, diagnóstico viral.

INTRODUCCIÓN

El virus del Dengue (DENV) genera una enfermedad hemorrágica aguda transmitida por medio de la picadura el mosquito hembra del género *Aedes Aegypti* (Fuentes, 2016), el cual se encuentra prevalente en Colombia debido a su ubicación tropical y la gran cantidad de factores ambientales que contribuyen a su reproducción en algunos de los departamentos del país (INS, 2019).

Actualmente es un grave problema de salud pública mundial para el cual aún no existe una vacuna efectiva ya que existen 4 diferentes tipos de Dengue que van desde DENV-1 a DENV-4, lo que hace que requiera de varios estudios para que esta sea neutralizante a los 4 serotipos. Por lo anterior, el aporte al conocimiento del comportamiento de este virus es importante para la ejecución de estrategias adecuadas para su control (Castrillón, Castaño & Urcuqui, 2015).

Tras una infección con DENV, el sistema inmune genera anticuerpos que buscan combatir la enfermedad hasta el punto de neutralizar y eliminar por completo este agente del sistema. Estos anticuerpos son 3 específicamente:

- Anticuerpos neutralizantes.
- Anticuerpos no neutralizantes.
- Anticuerpos de neutralización cruzada.

Para la identificación de los anticuerpos neutralizantes se realizan diferentes pruebas microbiológicas que buscan cuantificar el título de neutralización 50 (OPS, 2010), en este caso la gold standard es la PRNT (Plaque reduction neutralization test), por otra parte la que se está implementando por su alta especificidad es la Citometría de flujo. Estas pruebas se basan en la titulación de anticuerpos realizando diluciones seriadas en base diez (10, 100, 1000, etc) de la muestra de suero de un paciente con anterior exposición al virus. Estas diluciones son agregadas a un pozo con un cultivo celular, en el que las células están enlazadas al anticuerpo 4G2 unido a un sustrato cromogénico visible a la luz del día, más una cantidad conocida de virus DENV. Al generar estas diluciones, y agregarlas a los pozos junto con los componentes anteriormente mencionados, se visualizará cuál es la cantidad de anticuerpos neutralizantes contra el virus que presenta la muestra, de esta forma se determinará el porcentaje de infección y de neutralización en esta. Se identifica ya que a menor marcación de células con color violeta, mayor será la cantidad de anticuerpos contra el virus que presentará la muestra, una vez marcadas y contadas las células se busca el valor de la dilución en la cual el 50 % del virus es neutralizado (Kaiser, 2019.).

Sin embargo los resultados suelen tardar de cinco (5) a ocho (8) días, un alto costo y requieren de softwares y personal especializado. Por tanto, la falta de métodos de alto rendimiento para cuantificar los anticuerpos contra el virus del dengue en grandes cantidades de muestras de suero ha sido un obstáculo para probar la eficacia de una vacuna (Mattia et al., 2011; Payne, 2017). Por tal motivo, existe la necesidad de desarrollar una alternativa para la cuantificación automática de títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por infección con el virus del Dengue.

A través de metodologías basadas en la ingeniería al servicio del diagnóstico, se propone un método de visión artificial, como herramienta en la realización de este proceso en los laboratorios de investigación. La visión artificial hace referencia al proceso de detección de datos, análisis e interpretación de imágenes por medio de una computadora, por lo cual durante este proceso se deben realizar diferentes técnicas para la extracción de información de forma adecuada de las imágenes que se capturan. Esta metodología trae consigo el proceso de adquisición de la imagen, pre-procesamiento de esta, segmentación y extracción de información necesaria de la imagen (Olanchea, 2015).

Se propone un método con materiales y componentes de menor precio comparado con los métodos empleados actualmente, que potencialmente disminuye el error humano por medio de la cuantificación automatizada de células infectadas, y que otorga al usuario el títulos de anticuerpos neutralizantes, sin el uso de diferentes programas licenciados de alto costo (Graphpad, FlowJo). De esta manera, el personal que realice la prueba usando este método, lo hará usando un solo software (de producción original) robusto e intuitivo para el usuario, que genera un ahorro en el tiempo de procesamiento de la información y la entrega de resultados. Adicionalmente, en comparación con un citómetro de flujo, el diseño físico del prototipo facilita su portabilidad y lo convierte en un equipo de fácil manipulación y transporte.

Cabe resaltar que es una alternativa que permite apoyar demás procedimientos de investigación y de diagnóstico clínico para la definición de caso (en estudios de efectividad de vacunas o para prueba diagnósticas sobre presencia de NAbs contra virus DENV que no se ofrecen en Colombia). Adicional a esto, la presente invención posee el potencial de ser adaptado para la cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por la infección con otros virus de importancia epidemiológica, entre ellos SARS-Cov-2.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El Dengue (DENV) es un Flavivirus transmitido por mosquitos (Castellanos & Velandia, 2011) y la principal causa de enfermedad viral transmitida por artrópodos en el mundo; se conoce también como fiebre de la fractura debido a la severidad de los espasmos musculares y dolor en las articulaciones (Schaefer & Wolford, 2019).

En el boletín epidemiológico 39 del 2019, las entidades territoriales notificaron al Instituto Nacional de Salud (INS) 2.352 casos de dengue en Colombia, de los cuales el 1.1 % fueron considerados como graves y se relacionaron 182 muertes por el virus. Además de esto, informó que 14 departamentos del territorio nacional presentaron alta predominancia de DENV tipo 1, y se concluyó que en el año que corre se han presentado más casos de infección que los esperados, comparado con el comportamiento histórico de los años 2011 a 2019 (Cáceres, Vesga, Perea, Ruitorte & Talbot, 2009; EL TIEMPO, 2019; INS,2019).

Actualmente, en el Laboratorio de Investigación de la Universidad El Bosque, el grupo de Virología, se encuentra realizando un proyecto para analizar la prevalencia de Dengue en muestras de donantes en Colombia, posterior a que este culmine se realizarán pruebas para la cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes en las muestras inducidos por la infección con el virus (F. Delgado, comunicación personal, 10 de septiembre de 2019), lo cual hace parte de algunos de los análisis en la población para un estudio base realizado anterior a la creación de una vacuna y su posible introducción al mercado en un país (Vera, Morejón, Roche, Díaz & Tirado, 2013).

Sin embargo, la falta de métodos de alto rendimiento para cuantificar los anticuerpos contra el virus del Dengue en grandes cantidades de muestras de suero, ha sido un obstáculo para comprender el impacto de la eficacia de la vacuna al generar anticuerpos neutralizantes en el cuerpo humano (Mattia et al., 2011), lo cual es de gran importancia en Colombia donde la enfermedad es endémica (INS, 2019).

Actualmente para evaluar la eficacia de neutralización del Dengue por los anticuerpos, se realizan pruebas para cuantificar los títulos de anticuerpos inducidos por la neutralización de células infectadas con el virus (Álvarez et al., 1998; Coll, 1993; Salje et al., 2014; Vera et al., 2013). La primera de estas es la técnica gold standard, llamada Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) (Salje et al., 2014), que es una prueba de diagnóstico de máxima fiabilidad (Salech, Mery, Larrondo & Rada, 2008), sin embargo, como es una prueba biológica no presenta valores de exactitud, según teoría solo se dice que es confiable debido a que es altamente precisa, no obstante, requiere de personal experto para realizar el procedimiento, demanda largos periodos de tiempo debido a que se requieren de 5 a 8 días para obtener resultados y además, el conteo de placas se debe realizar de forma visual lo que puede incrementar el porcentaje de probabilidad de error humano (20-30 % de aumento de posibilidad de error en el método) (Sevilla, 2018).

Para contrarrestar estos inconvenientes, se han desarrollado pruebas alternas también utilizadas para la cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes a partir de la cuantificación de células infectadas y su posterior conversión a títulos de anticuerpos a partir de Citometría de flujo, (Atanasova et al., 2019; Barrera et al., 2004; de Alwis & de Silva, 2014) sin embargo, su costo puede oscilar entre 50.000.000 a 250.000.000 de pesos colombianos entre costos del equipo, los softwares que se emplean en la prueba y los elementos de uso en el equipo (Sustancias de limpieza, perlas de calibración, entre otros), además de que se requiere de personal calificado para realizarlo, una duración del proceso de 4 a 8 horas que dependen de: Número de pozos a cuantificar, tiempo de limpieza del equipo con sustratos al iniciar y terminar el proceso (Debido a que entra en contacto directo con las muestras a estudiar) y de la calibración del equipo al iniciar la prueba, por último la prueba requiere de una adecuación del lugar donde se realiza la muestra para evitar errores causados por agentes externos (J. Castellanos, comunicación personal, 10 de septiembre de 2019; Nasi et al., 2015).

Existen también dispositivos utilizados para cuantificar células, que presentan un precio menor que los mencionados anteriormente tales como el Hemocitómetro o Cámara de Neubauer, sin embargo, este proceso es tedioso, consume tiempo, y dependiendo del operador incrementa la probabilidad de presentar mayor porcentaje de errores humanos al ser cuantificadas visualmente por una persona (Lai, 2014).

Debido a lo mencionado anteriormente, la realización de estas pruebas en algunos laboratorios de investigación del país toman altas cantidades de tiempo, dinero y además de que generan un incremento en el porcentaje de error de pruebas por error humano, generando que el estudio sobre la eficacia de los anticuerpos tarde mayor tiempo (Figura 1.1) (Murillo, 2012).

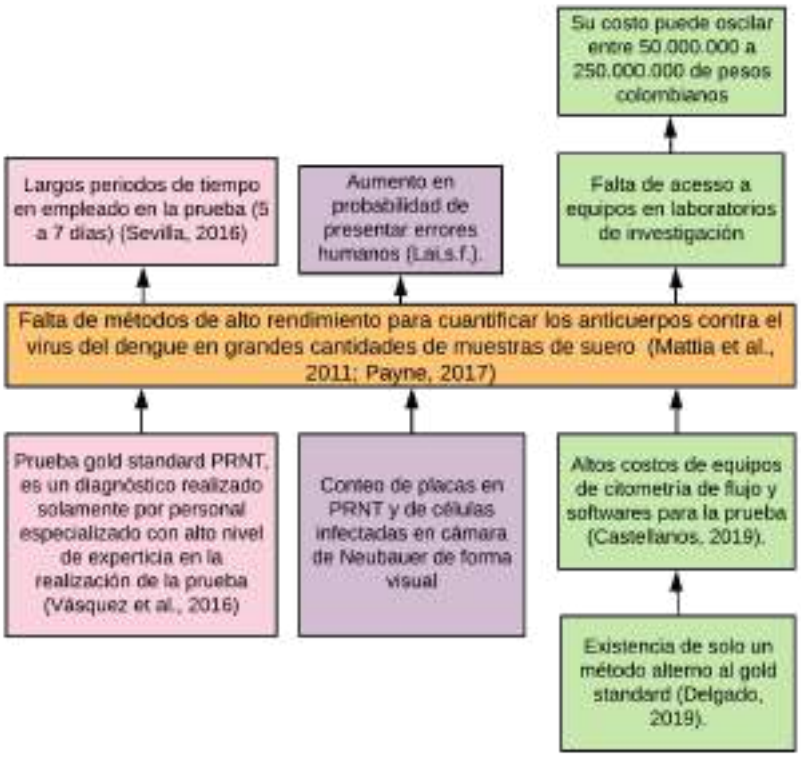


Figura 1.1: Árbol de problema. Fuente: Elaboración propia.

2. JUSTIFICACIÓN

En lo recorrido del 2019, Colombia ha reportado 2.352 casos de infección con virus del Dengue y 182 muertes relacionadas con este, por lo que se determinó que la infección con el virus aumentó en un 270,1 % con respecto al año anterior. (EL TIEMPO, 2019; INS, 2019).

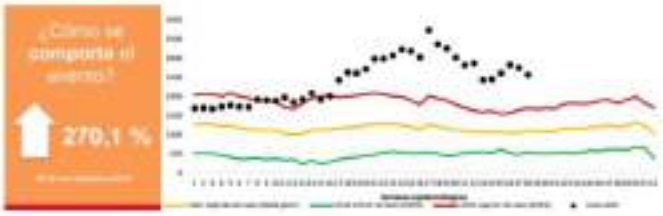


Figura 2.2: Casos de dengue en Colombia semanas epidemiológicas 1 a 39 del 2019. Fuente: INS, 2019.

Se debe tener en cuenta que el serotipo predominante que se encuentra circulando en el país, con alrededor del 70 % de incidencia en los departamentos es el DENV1 (INS, 2019), por lo cual en el proyecto se estudiarán los títulos de anticuerpos neutralizantes contra este serotipo, presentes en 13 muestras de suero de individuos donantes de sangre con anterior exposición al virus (Tamaño de muestra calculado de acuerdo con número de muestras de correlación de Pearson)(Pértegas & Pitas, 2002).

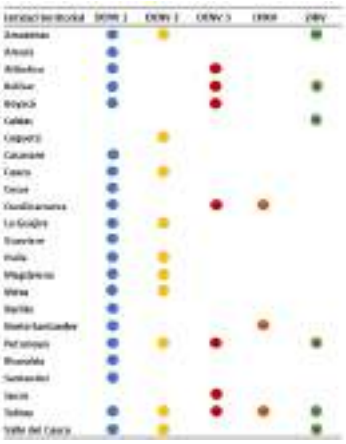


Figura 2.3: Identificación de serotipos del virus dengue en los departamentos priorizados de Colombia en 2019. Fuente: INS, Entomología, 2019.

La falta de métodos de alto rendimiento para cuantificar los anticuerpos contra el virus del Dengue en grandes cantidades de muestras de suero ha sido un obstáculo para probar la eficacia de una vacuna (Mattia et al., 2011; Payne, 2017), ya que en los métodos usados actualmente se requiere de dispositivos y softwares especializados que tienen costos elevados (J. Castellanos,comunicación personal, 10 de septiembre de 2019), personal calificado, gran cantidad de horas de trabajo e instalaciones adecuadas para utilizarlos (Atanasova et al., 2019; Barrera et al., 2004; Consejo Superior de Investigación Científica, 2015; Murillo, 2012; Salje et al., 2014).

Debido a lo mencionado anteriormente, existe la necesidad de desarrollar un método que utilice visión artificial, con la finalidad de ayudar en procesos de laboratorios de investigación como alternativa para la cuantificación automática de títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por infección con el virus del Dengue.

A partir de dispositivos desarrollados por parte de la ingeniería al servicio del diagnóstico, se propone un método de menor precio comparado con los otros métodos empleados (PRNT, Citómetro de flujo) (Salje et al., 2014; Vázquez, Domínguez & Guzmán, 2016). Que disminuya el error humano por medio de la cuantificación automatizada de células infectadas, además de que realice los cálculos de conversión de células infectadas a títulos de anticuerpos elaborados con tres distintos softwares (Graphpad, Excel, FlowJo).Por parte del personal que realiza la prueba con un solo software libre todo esto, con el fin de que no se deba adquirir la licencia de softwares, además de esto, que el proceso sea realizado en menor tiempo a comparación de las técnicas usadas normalmente. Que igualmente sea intuitivo para el usuario, robusto.Y por último que sea portátil para mejorar la posibilidad de manipulación y transporte del equipo.

Con esta investigación es posible contribuir a los futuros desarrollos en el campo del procesamiento digital de imágenes de seres microscópicos, mediante las técnicas propuestas (Bustamante, 2019). Los bioingenieros han sido formados con conocimientos sobre áreas de biología celular, electrónica y programación (California University, 2019), por lo que presentan las capacidades para aportar al diagnóstico de entes biológicos, con el fin de desarrollar el método mencionado anteriormente.

3. **OBJETIVOS**

3.1. Objetivo General

Desarrollar un método de cuantificación automática de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico por medio de visión artificial, para la determinación de título de anticuerpos neutralizantes inducidos por infección con Dengue.

3.2. Objetivos Específicos

- Construir un conjunto de imágenes sintéticas a partir de imágenes reales de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico para simular diferentes porcentajes de infección con Dengue.
- Elaborar un algoritmo para la cuantificación del porcentaje de infección de las células en las imágenes sintéticas creadas por medio de técnicas de procesamiento de imágenes.
- Implementar un procedimiento con regresión logística para la conversión de porcentaje de infección celular a títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus Dengue.
- Evaluar el desempeño del método propuesto para la cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes.
- Realizar el diseño del prototipo para la adquisición de imágenes de células no infectadas e infectadas con Dengue marcadas con sustrato cromogénico y suspendidas en cámara de Neubauer.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Marco Teórico

4.1.1. Virus del Dengue

También llamado por su acrónimo DENV, se denomina como una enfermedad viral aguda (Guzmán, 2016). Es un arbovirus, es decir transmitido por artrópodos, del género Flavivirus, familia Flaviviridae (Rodríguez & Gould, 2013).

En este caso el vector de transmisión son mosquitos hembras de las especies *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* (Cáceres, Castellanos & Rodríguez, 2019). La transmisión e interacción entre virus y vector se da a partir de la contaminación del mosquito en piezas bucales, patas, regurgitación y excretas y demás fluidos del cuerpo de este, con sangre que presente determinado nivel de concentración viral (Fuentes, 2016). La sangre infectada llega al intestino medio y allí es transportado por la hemolinfa a diferentes partes del insecto. En la zona del tórax es donde ocurre la replicación viral, posterior a esto el virus llega a las glándulas salivales por lo que al momento que un individuo es picado por el mosquito (Figura 4.4), el virus pasa a su torrente sanguíneo (Fuentes, 2016). Para que se lleve a cabo este proceso el período de incubación dentro del mosquito es de 8 a 12 días, después de este período, es capaz de transmitir el virus a los humanos durante toda su vida (Thomas & Rothman, 2019). Una vez se haya contagiado al humano, este es capaz de infectar a otros mosquitos con su sangre desde tres días antes que comiencen los síntomas del virus (Fuentes, 2016).

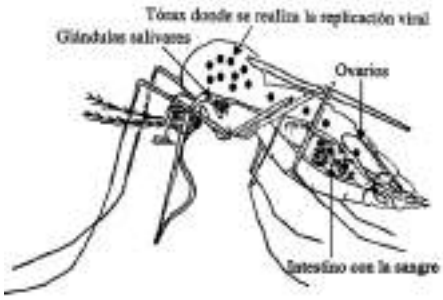


Figura 4.4: Transmisión e interacción entre virus y vector. Fuente: Fuentes, 2016.

4.1.1.1. Características del virus

Una partícula madura de Flavivirus presenta un tamaño de aproximadamente 50 nanómetros (nm) de diámetro, con una envoltura lipoproteíca que en su interior contiene una nucleocápside con estructura icosaédrica (Figura 4.5) (Dominguez, 2016).

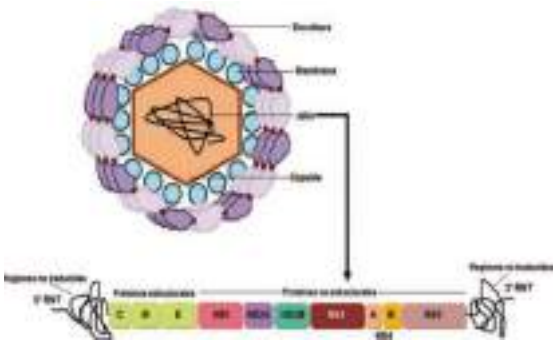


Figura 4.5: Estructura viral del DENV. Fuente: Laredo, Guo & Bocanegra, 2012.

El virus presenta un genoma ARN con polaridad positiva de 11 kb (kilobases), que codifica diez proteínas que formarán el virus: 3 estructurales y 7 no estructurales (Figura 4.6). Las estructurales son la proteína de Cápside (C), Proteína de Membrana (prM), y proteína de Envoltura (E). Las proteínas no estructurales (NS) son NS1, NS2A, NS2B, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Beita, Salazar & Valverde, 2016).

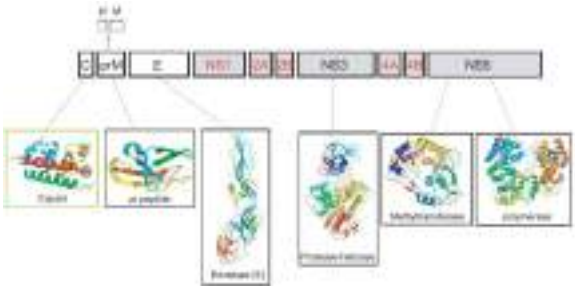


Figura 4.6: Proteoma estructural del virus del dengue. (Se muestran para los dominios de la estructura de la proteína C, prM, E, NS3 y NS5. Las estructuras actualmente no están disponibles para las proteínas denotadas en rojo. Fuente: Perera & Kuhn, 2008.

La replicación del virus se basa en distintos pasos, como primera parte el virus presenta una fijación a la membrana celular y entra al citoplasma celular por endocitosis, allí da lugar a la traducción de proteínas virales, siguiente a este paso realiza la replicación del genoma viral de ARN y el ensamblaje viral en el retículo endoplásmico de la célula, siguiente a esto, el aparato de Golgi ocurre la formación de viriones y por último la maduración del virión se da en la red trans Golgi donde las partículas se acumulan en grandes cantidades y son liberadas de la célula por exocitosis (Dominguez, 2016; Thomas & Rothman, 2019).

Existen cuatro serotipos distintos del virus del dengue, que comparten relaciones antigénicas, estos son llamados: DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 (Rodríguez & Gould, 2013), los cuales poseen diferencias entre sus secuencias de aminoácidos, como ejemplo se tiene que la proteína E del DENV3 difiere aproximadamente en el 7 % de aminoácidos residuales de esta (Cáceres et al., 2019).

Se debe tener en cuenta que la infección con un serotipo genera protección de por vida contra ese serotipo, sin embargo, no protege contra una infección secundaria con un serotipo heterólogo (Rodriguez & Gould, 2013). De hecho, los anticuerpos no protectores, pero con reacción cruzada pueden aumentar la gravedad de la enfermedad, también llamado fenómeno Amplificación de la infección dependiente

de anticuerpos (ADE) (Cáceres et al., 2019).

Recientemente, tres estudios clínicos realizados con pacientes en Nicaragua y Tailandia, evaluaron el riesgo de enfermedad grave por dengue posterior a una infección primaria, encontraron que las bajas concentraciones de anticuerpos contra el virus del dengue, los cuales se asociaron con el mayor riesgo de síntomas graves, con 7.64 % más de probabilidad que los que poseen un alto contenido de anticuerpos o aquellos que eran seronegativos para la infección por DENV (Katzelnick et al., 2017; Salje et al., 2018).

4.1.1.2. Enfermedad

La fiebre del dengue (FD), es también llamada fiebre de la fractura debido a la severidad de los espasmos musculares y dolor en las articulaciones, fiebre dandy o fiebre de siete días debido a la duración habitual de los síntomas (Schaefer & Wolford, 2019). Las infecciones primarias con dengue suelen ser ligeras y se caracterizan por un cuadro típico de fiebre, dolor de cabeza frontal, dolor ocular, mialgia, artralgia y erupción cutánea, generalmente con duración de una semana, el cual es un cuadro típico de FD (Carabali, Hernandez, Arauz, Villar & Ridde, 2015; Guzmán, 2016).

La fiebre hemorrágica del dengue (FHD), ocurre en hasta el 5 % de los casos de dengue (Rodríguez & Gould, 2013). Inicialmente se caracteriza por la misma variedad de síntomas clínicos que se observan en el DF. Sin embargo, sus síntomas son peores en la mayoría de los casos, debido a una reinfección del virus con un serotipo diferente al de la infección primaria (Martinez, 2016; Thomas, Rothman, Srikiatkhachorn & Kalayanarooj, 2019).

Existen tres tipos de clasificación clínica por infección del virus, determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009. Estas son:

- Dengue sin síntomas de alarma: Se determina si el paciente presenta un síndrome febril inespecífico y estuvo en áreas endémicas.
- Dengue con síntomas de alarma: La enfermedad se manifiesta con dolor abdominal intenso y continuo, vómito persistente, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, alteración del estado de conciencia, hepatomegalia y aumento progresivo del hematocrito.
- Dengue grave: Las formas graves de dengue se definen por uno o más síntomas de choque por extravasación del plasma, acumulación de líquido con dificultad respiratoria, sangrado profuso, y compromiso grave de órganos (OMS,2009; OPS,2010).

Y presenta los síntomas representados en la figura 4.7.

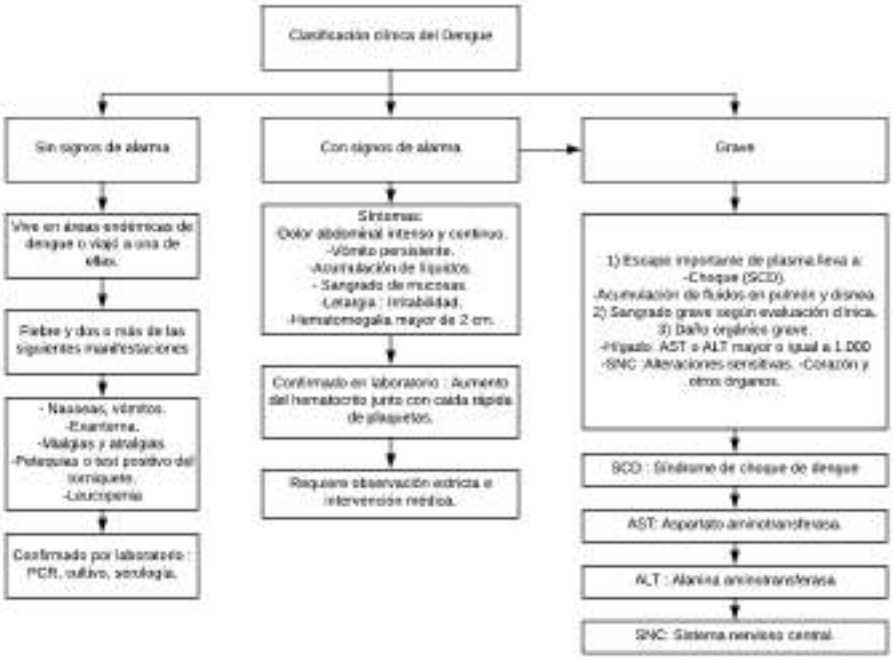


Figura 4.7: Clasificación clínica del dengue.Fuente: OPS, 2010.

4.1.1.3. Dengue en Colombia

El dengue en Colombia representa un problema prioritario en salud pública debido a la reemergencia e intensa transmisión con tendencia creciente, debido a (INS, 2019):

- Comportamiento de ciclos epidémicos cada dos o tres años.
- Aumento en la frecuencia de brotes de dengue grave.
- Circulación simultánea de diferentes serotipos.
- Reintroducción del serotipo tres.
- Infestación por *A. Aegypti* de más de 90 % del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm.
- Introducción de *Aedes albopictus*, el cual es otro vector del virus.
- Resistencia de vectores a insecticidas.
- Falta de suministro de agua potable.
- Mal manejo de desechos.
- Condiciones climáticas epidemiológicas aptas para la reproducción del mosquito (INS, 2019).

Con respecto al mismo periodo 2018, es decir septiembre del año anterior, se observó un aumento del 270,1 % en la notificación de dengue (Figura 4.8), durante el 2019 se han notificado 182 muertes probables por dengue, de las cuales 60 han sido confirmadas (INS, 2019).

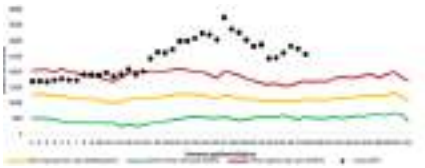


Figura 4.8: Casos de dengue en Colombia semanas epidemiológicas 1 a 39 del 2019. Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2019

En la semana epidemiológica 39 de 2019 se notificaron 2.352 casos probables de dengue. En el sistema existen 94.545 casos, 45.488 (48,1 %) de estos sin signos de alarma, 48.045 (50,8 %) con signos de alarma y 1.012 (1,1 %) de dengue grave. Por procedencia, los departamentos de Meta, Tolima, Huila, Santander, Norte de Santander, Casanare, Cesar y Antioquia han atribuido el 65,4 % de los casos de dengue a nivel nacional (INS, 2019).

El Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS) implementó la vigilancia entono virológica de hembras de *Aedes aegypti* priorizando los departamentos en los que mediante RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction), se identificaron los serotipos de DENV 1,2,3 y 4 (INS, 2019). Visualizado en la siguiente figura:

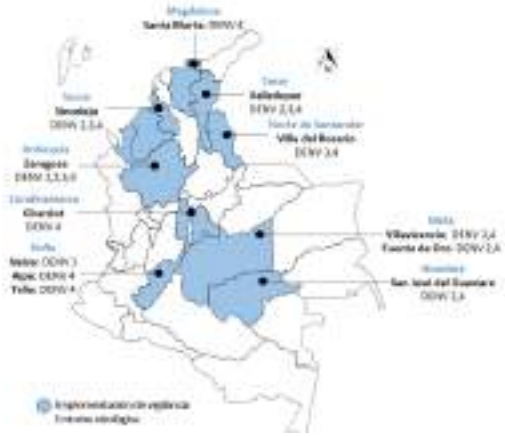


Figura 4.9: Identificación de serotipos del virus dengue en los departamentos priorizados de Colombia en 2019. Fuente: Instituto Nacional de la Salud. Entomología, 2019.

Con respecto al serotipo circulante del virus dengue (DENV), se puede visualizar que el serotipo predominante en Colombia con alrededor del 70 % de incidencia en los departamentos es en DENV1 (INS, 2019). En el proyecto se estudiará un solo serotipo, es decir el DENV1, ya que en Colombia se presenta una alta prevalencia de este.

4.1.1.4. Anticuerpos generados por infección del Dengue

Un anticuerpo (Abs) es una inmunoglobulina (Ig) que forma un grupo de glicoproteínas, formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (Heavy chain) y dos livianas (Light chain), idénticas entre sí (Figura 4.10). Están presentes en suero y su producción es inducida al momento que el sistema linfático del paciente se pone en contacto con una estructura desconocida invasora, es decir un antígeno (Vázquez, Domínguez& Guzmán, 2016).

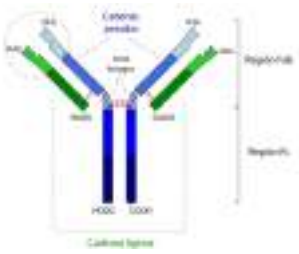


Figura 4.10: Partes de un anticuerpo. Fuente: Padial, 2018.

La función de estos es identificar los cuerpos invasores, unirse y trabajar para eliminarlos, se une al antígeno de forma independiente en su epítopo, por medio de la zona Fab (Antigen binding fragment) y su correspondiente paratope, ubicado en cada brazo de la forma Y que tiene (Figura 4.11), es decir que los anticuerpos son bivalentes (Vázquez, Domínguez & Guzmán, 2016).

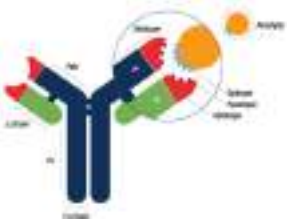


Figura 4.11: Zonas de unión antígeno-anticuerpo. Fuente: Rockland Immunochemicals Inc, 2019.

Se debe tener en cuenta que existen dos tipos de anticuerpos generados durante una infección por dengue, los cuales son (Guzmán, 2016):

- Anticuerpos neutralizantes de tipo específico para un serotipo.
- Anticuerpos no neutralizantes de reactividad cruzada.
- Anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada.

El fenómeno de ADE, significa Antibody Dependent Enhancement, que consiste en la existencia de una reacción heterológa entre anticuerpos neutralizantes para el serotipo de la infección anterior, que se convierten en no neutralizantes de reactividad cruzada para el serotipo de la nueva infección (Cáceres et al., 2019).

Usualmente se relaciona con la patogénesis de cuadros severos, generando un aumento en las células infectadas, de producción de virus y de viremia, ya que permite una aproximación de la partícula viral

a su receptor en la célula y facilita su ingreso. Por esta razón los individuos infectados por segunda vez con un serotipo diferente al de la infección primaria son más propensos a desarrollar dengue hemorrágico (Cáceres et al., 2019; Guzmán, 2016).

Como resultado de una infección viral, el cuerpo produce altas cantidades de anticuerpos que se unen a los virus, que no los neutralizan, pero tienen un papel en el control de una infección viral. Funcionan de diversas maneras que pueden dar lugar a fagocitosis de los viriones:

- Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.
- Citotoxicidad mediada por el complemento.
- Fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (Payne, 2017).

En este paso las regiones Fc de las Ig son clave para estos mecanismos, ya que son reconocidas por las células inmunitarias y las proteínas, por lo que estos efectores se dirigen a los viriones o células infectadas por virus (Payne, 2017).

El diagnóstico específico de la infección por dengue por serología se basa en ensayos que detectan anticuerpos neutralizantes (NAbs), los cuales son un mecanismo importante de protección contra la infección con el virus DENV hacia las células blanco (de Alwis & de Silva, 2014). Se calculan mediante pruebas para evaluar su capacidad para inhibir la replicación del virus en células, algunos evitan que los virus se unan a los receptores, otros actúan en el ciclo de infección, bloqueando la penetración o eliminando el revestimiento celular (Payne, 2017).

Este proceso de inhibición se ve representado en la figura 4.12, en la cual se observa que los Abs, se encuentran en muestras de suero de un individuo, los cuales van disminuyendo en relación al aumento de dilución en el que se encuentre esta (Mattia et al.,2011). Por lo que al momento que el suero entra en contacto con el virus, los Abs presentan una región Fab que se une y cubre las moléculas de unión viral antes de que estos ingresen a la célula blanco la cuales son células dendríticas con un tamaño de 12 a 25 μm, monocitos 15 a 33 μm o macrófagos 15 a 30 μm (Longo, 2016). En el caso de que no haya suficiente cantidad de NAbs, el virus logrará unirse a la célula, ingresar a esta e infectarla y generar un efecto citopático, es decir daño y muerte celular (Chawla et al., 2013; Klasse, 2019; Sasaki et al., 2013).

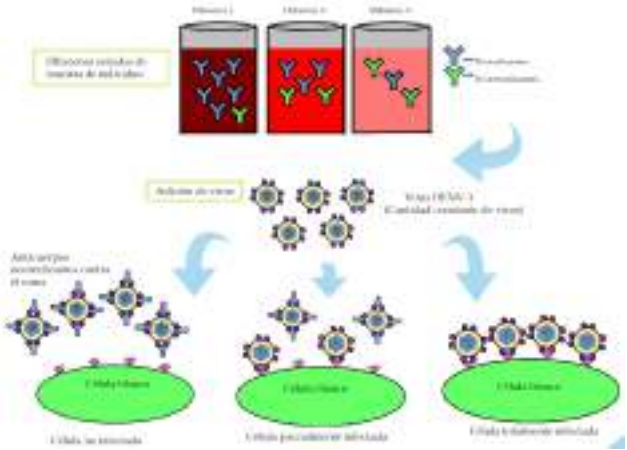


Figura 4.12: Actividad de anticuerpos neutralizantes contra el virus DENV-1. Fuente: Kaiser, 2019.

4.1.2. Métodos de identificación de anticuerpos neutralizantes

4.1.2.1. Técnica de neutralización por reducción del número de placas (PRNT)

La prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) se considera un método de laboratorio 'estándar de oro' para los estudios de neutralización de virus (Cohen, Doblas & Andrews, 2008), es un ensayo cuantitativo, de gran especificidad y sensibilidad, como tambíen de alto costo, laborioso (gran demanda de tiempo durante su proceso de realización) y con un requerimiento de personal altamente calificado. Es un ensayo biológico basado en el principio de interacción de los virus y los anticuerpos que resulta en la inactivación de los virus de manera que ya no puedan infectar ni reproducirse en un cultivo celular.

El PRNT del dengue se realiza en en células LLC-MK2 (células de riñón de mono Rhesus), Vero (riñón de mono verde africano) y BHK-21 (células de riñón de hámster bebé), usando monocapas de los cultivos celulares en placas de 24 pocillos sembradas con 1 mL de 3 x 104 en suspensión de células por pocillo en medio esencial mínimo (MEM) (Gibco BRL) con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, glutamina al 1 % y 100 unidades de penicilina y estreptomicina (Gibco BRL), se incuban durante 3 a 4 días a 35°C (Thomas et al., 2009).

Posteriormente, se incuban las diluciones seriadas de mezclas de suero y virus, colocando 0,1 mL de la mezcla en cada pozos, se establecen los controles positivos (virus sin suero) para cada ejecución de ensayo, con el fin de asegurar la infectividad de la monocapa celular (formación de más de 25 placas) (Figura 4.13).

Después del proceso de dilución, estas muestras son colocadas en placas de hasta 96 pozos con una base de agarosa (Vázquez et al., 2016). Las placas son incubadas a 35°C en 5 % de CO2 durante 4 horas (Cohen et al., 2008), y se cuentan al día siguiente, teniendo en cuenta las zonas de aclaramiento en el agar causadas por el efecto citopático en la célula por el ingreso del virus a esta (Thomas et al., 2009).

Esta prueba permite la detección del número de anticuerpos neutralizantes que se encuentran dentro de una muestra como también el serotipo si el virus a cuantificar tiene más de uno (Vázquez et al., 2016).

4.1.2.2. Cuantificación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) por medio de PRNT

Una vez la muestra esté en cada uno de los pozos se realiza la coloración de los pozos la cual normalmente es realizada con azul negro de naftol o cristal violeta permitiendo al experto realizar un conteo de huecos en el pozo (Figura 4.13), causados por la infección por el virus en las células, indicando la cantidad de células infectadas por el virus a dicha dilución (Sevilla Drozdek, L. A. ,2018).

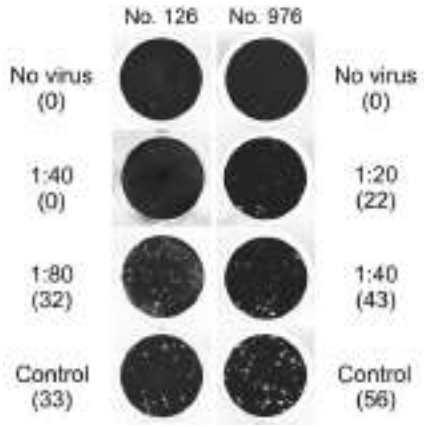


Figura 4.13: Resultado ensayo PRNT. Fuente: Liljander et al., 2016.

Se usa un análisis probit para determinar el título de suero requerido para reducir las placas virales del dengue en un 50 % (PRNT50) (Thomas et al., 2009). Los controles positivos deben neutralizar al virus y la última dilución del suero debe mostrar 50 % de reducción de placas (Sevilla, 2011).

4.1.2.3. Citometría de flujo

Es una técnica avanzada usualmente utilizada para la detección de inmunofenotipos presentes en células, permite obtener información acerca de un gran número de células aproximadamente 5000 a 10000 células en una muestra. Este procedimiento se realiza para cada célula individual es decir se analiza una por una las células a caracterizar. Para la realización de dicha caracterización la citometría de flujo utiliza anticuerpos monoclonales para detección de algún antígeno específico los cuales se les ancla un fluorocromo o solo se marcan las células con el fluorocromo que se hacen visibles a través de un haz de luz proveniente del Citómetro que excita el fluorocromo haciendo que emita una luz de longitud mayor a la que se le incide como se puede ver en la figura 4.14, a partir de dicha luz emitida se caracteriza la célula basado en la intensidad de la luz emitida en nanómetros, estos datos son almacenados y utilizados para la diferenciación de características entre células (Marsán Suárez et al., 2015).

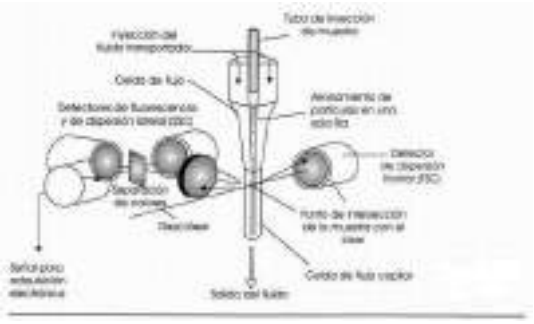


Figura 4.14: Funcionamiento de Citómetro de flujo. Fuente: Barrera, 2004.

4.1.2.4. Cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes (NAbs) por medio de citometría de flujo

El ensayo gold standard actual para medir las respuestas neutralizantes de Abs contra DENV es el ensayo de PRNT nombrado en el anterior numeral. Sin embargo, este ensayo es lento ya que sus resultados se tardan entre 5 a 7 días, además de que laborioso, requiere de personal altamente capacitado y utiliza líneas celulares fisiológicamente irrelevantes (de Alwis & de Silva, 2014; Sevilla, 2018; Vásquez et al., 2016). Por lo que se se realiza el ensayo de neutralización basado en citometría de flujo como alternativa (Lambeth, White, Johnston & de Silva, 2005), el cual ha presentado un rendimiento relativamente alto para DENV ya que ha sido optimizado para su uso con una línea de células de suspensión monocítica humana, U937+DC-SIGN, las cuales son similares a las células blanco del virus en el cuerpo humano (de Alwis & de Silva, 2014; Delgado, 2019) .

La cuantificación de títulos de anticuerpos realizados por medio de citometría de flujo se ve descrita en el artículo escrito por de Alwis y de Silva (2014), ha sido utilizada como referencia en los diferentes laboratorios de investigación, el cual se basa en 6 pasos principales:

El primero tiene como finalidad encontrar el porcentaje de células infectadas por medio del citómetro de flujo (M2), y las células individuales (M1), seguido de esto, los parámetros de la citometría de se establecen utilizando un pocillo de muestra no infectado, es decir un control negativo y sólo de células, como control positivo (de Alwis & de Silva, 2014).

El porcentaje de células infectadas tiene una relación inversamente proporcional a los valores de títulos de anticuerpos existentes en la muestra (De Alwis & de Silva, 2014), este último no puede ser cuantificado de forma directa por medio de citometría de flujo por lo que es necesario llegar a este parámetro de forma indirecta cuantificando el porcentaje de células infectadas.

Una vez finalizado el proceso de adquisición de datos, los datos se abren en un software de análisis de datos de citometría de flujo como FlowJo, Summit, o GuavaSoft, y luego se exportan estos valores de porcentaje de infección (M2) a una hoja de Excel de Microsoft (de Alwis & de Silva, 2014). En la hoja de análisis de Excel se deben realizar las siguientes operaciones:

La primera es para determinar el porcentaje infección de cada muestra, restando cualquier valor porcentual de infección del control negativo, a partir del porcentaje de valores de infección de todas las muestras experimentales.

Seguido de esto se calcula el porcentaje de neutralización (Nx), inducido por los anticuerpos neutralizantes presentes en la muestra del individuo(s), y además el promedio de los valores porcentuales de infección obtenidos de pozos tratados únicamente con células y virus (DVAv).

Después de hallar estos valores, por medio del software GraphPad Prism, los valores de neutralización porcentual se tabulan y se grafican con relación al valor de Log(1/Dilución). Como se muestra en la figura 4.15, los datos ingresados, son ajustados a una curva sigmoidal de dosis-respuesta por medio de una regresión logistica (Kleinbaum & Klein, 2010) y el valor que se debe hallar es el de 50 % de neutralización (Neut50), que se obtiene a partir del gráfico (de Alwis & de Silva, 2014).

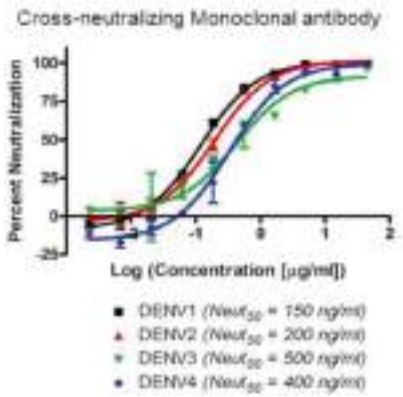


Figura 4.15: Curva sigmoidal de dosis-respuesta. Fuente: de Alwis & de Silva, 2014.

Donde Neut50 se refiere a la dilución, en este caso llamada como título con el cual se neutraliza un 50 % de la infección por el virus en la muestra (Kraus, Messer, Haymore & de Silva, 2007).

La citometría de flujo puede ser un método de cuantificación avanzado y de gran especificidad pero al igual que muchos otros también presenta algunas desventajas en cuanto a su uso, sus equipos y metodologías. Algunas de estas desventajas son: los equipos que se utilizan son de elevado costo lo cual hace que no sea completamente asequible en algunos laboratorios de investigación, requiere de tres softwares de apoyo (Graphpad, Excel, FlowJo, Summit, o GuavaSoft), seguido de esto esta técnica es incapaz de de diferenciar entre células presentes en la muestra y requiere de una metodología de suspensión de células la cual limita el estudio de diferentes tejidos (Marsán Suárez et al., 2015). Además de esto el equipo requiere de calibración y limpieza tras cada uso y de un tiempo de análisis y respuesta de cuatro a seis horas por lo que el proceso en total puede tardar casi 8 horas (F, Delgado, comunicación personal, 25 de octubre de 2019).

4.1.3. Métodos de conteo de células alternos

4.1.3.1. Microscopía de fluorescencia

Es una técnica utilizada para la identificación virus dentro de la célula o los diferentes componentes que hacen parte de la célula. Esta técnica de identificación utiliza sustancias naturales o fluorocromo que son aplicados a la célula o células que se desean visualizar. El microscopio proporciona un haz de luz que excita las sustancias naturales aplicadas o el fluorocromo haciendo que se emita una luz de diferente longitud visible al ojo humano en microscopio (Figura 4.16). Estos microscopios tienen componentes como el haz de luz que proviene de una lámpara especial y filtros especiales que son los encargados de permitir el paso de la luz emitida por el fluorocromo para su visualización (Consejo Superior de Investigación Científica, 2015). Para ser cuantificadas y visualizadas a color se utilizan softwares especializados, este permite adquirir imágenes de alta resolución a través de técnicas potentes de procesamiento de imágenes, como la deconvolución, además de que brinda acceso a un amplio rango de métodos de análisis, como la descripción de intensidad, la medición automática del objeto y la clasificación (OLYMPUS, 2019).

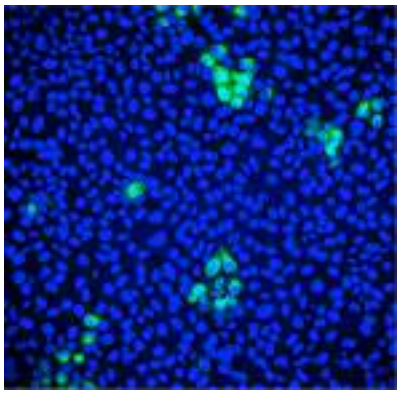


Figura 4.16: La microscopía de fluorescencia se puede usar para cuantificar el porcentaje de células infectadas.(Verde: células infectadas por el virus Zika; Azul: núcleos celulares). Fuente: Thenativeantigencompany.com, 2019

Se relaciona con la cuantificación de títulos de NAbs, que ya la microscopía de fluorescencia es utilizada para la cuantificación de células infectadas por medio de imágenes, donde el microscopio de fluorescencia capta la imagen de las células con un marcador fluorescente que las identifica como infectadas y posterior a esto toma una fotografía con una cámara monocromática la cual envía la foto a un computador y con ayuda de un software que posee el laboratorio de investigación se realiza la cuantificación de las células infectadas, sin embargo, el software requiere de personal altamente capacitado para utilizarlo por lo que no es empleado de forma constante en el laboratorio (J, Castellanos, comunicación personal, 10 de septiembre de 2019).

4.1.3.2. Cámara de Neubauer

Es un método de conteo de células que deben encontrarse en una suspensión acuosa , como en la citometría de flujo. En estas cámaras contienen en su interior unas divisiones(Figura 4.17) las cuales ayudan en la orientación cuando se está realizando el conteo de las células en suspensión (Bustillo, 2010) al ser visualizadas en un microscopio. Fue inventada originalmente para contar las células sanguíneas en el siglo XIX por un anatomista francés, Louis Charles Malassez (Lai, 2014).

Figura 4.17: Cámara de Neubauer de dos rejillas y diez rejillas. Fuente: Bustillo, 2010

Estas cámaras al igual que el portaobjetos necesita de un cubreobjetos encima de la muestra y cada uno contiene dos áreas en la cuales se puede realizar el conteo por medio de microscopios, en donde la limitación lateral del volumen a contar se forma mediante las superficies imaginadas por la proyección

vertical sobre las líneas exteriores de la cuadrícula de recuento, contiene una hendidura rectangular que crea una cámara de 100 μm de profundidad, esta se ve visualizada en la figura 4.18 (Bustillo, 2010). El proceso de cuantificación se realiza bajo un microscopio óptico convencional debido a que el tamaños de las células se encuentra en el orden de los micrómetros, por lo cual se requiere de un lente de aumento, primero se enfoca con objetivo de 10X y luego se pasa a 40X (Figura 4.18), además de esto se ajusta la luz con el fin de que las líneas sean completamente visibles, se baja el condensador y se cierra un poco el diafragma (Bustillo, 2010).

Figura 4.18: Fotografía con resolución de 400 pp de muestra de eritrocitos (De tamaño de 6 a 8 μm en cámara de Neubauer). Fuente: Muñóz, 2012.

Hoy en día, sigue siendo una de las herramientas más utilizadas en laboratorios para cuantificar el número de células mediante recuento manual. Sin embargo, el proceso de recuento de células es tedioso y lleva mucho tiempo e inexacto, debido a los sesgos dependientes del operador. Varios estudios han reportado el desarrollo del procesamiento de imágenes programas para automatizar el recuento de células para hacer más eficiente el proceso y reducir el error (Lai, 2014).

4.1.3.3. Sustrato cromogénico

Para identificar las células infectadas de otras en una cámara de Neubauer, se debe realizar la marcación con sustrato cromogénico ya que estos son posibles de ver a simple vista, se definen como "Compuesto o sustancia que contiene un grupo formador de color", como ventajas del uso de estos se ha encontrado que (Manafi, Kneifel & Bascomb, 1991; Brown, 2019).

- Visualización en espectro de luz.
- Presentan facilidad de uso e interpretación.
- Requiere de entrenamiento requerido mínimo.
- Permite un uso más apropiado del personal experimentado.
- Rendimiento mejorado ya que se obtienen resultados más rápido.
- Volumen reducido del trabajo de seguimiento.
- En cuanto a la rentabilidad evitan costo extra de medios.

A diferencia de los sustratos fluorescentes, utilizados en microscopía de fluorescencia y en citometría de flujo, los cuales necesitan un rango de longitud de onda específica para lograr una excitación para las fluorocromos, posterior a esto la luz debe pasar por filtros para cada color, y así podrá ser visible para el ojo humano, como se visualiza en la figura 4.19 (Brown, 2019; Manafi, Kneifel & Bascomb, 1991).

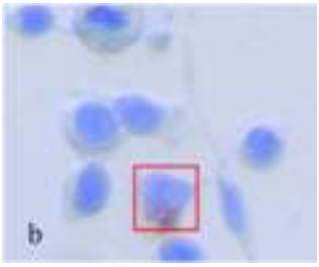


Figura 4.19: Identificación de células infectadas con Dengue a partir de sustrato cromogénico. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque.

Para realizar la identificación de células infectadas con Dengue a partir de sustrato cromogénico DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahychloride), se emplea un anticuerpo cultivado en ratón llamado 4G2, el cual, identifica al virus como su antígeno (Reconoce la proteína E del flavivirus), este además es enlazado a un anticuerpo anti-ratón el cual contiene una enzima llamada HRP (horseradish peroxidase) que metaboliza el sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno y genera un producto insoluble de color café oscuro o morado, como se visualiza en la figura 4.20 (Ungaro, Abreu & Fukata, 2009).

Figura 4.20: Identificación de células infectadas con Dengue a partir de sustrato cromogénico. Fuente:Ungaro, Abreu & Fukata, 2009.

4.1.4. Procesamiento de imágenes

El procesamiento digital de imágenes es un conjunto de técnicas que permiten mejorar la calidad de las imágenes con el objetivo de prepararlas para la extracción de información (Olanchea, 2015).

La importancia de los sistemas procesamiento digital de imágenes se debe al papel que desempeña en las tecnologías de la información y comunicación. Actualmente es la base de una serie de aplicaciones que incluye diagnóstico médico, percepción remota, visión por computador, robótica, entre otros (Bustamante, 2019).

En este caso, el análisis de imágenes cuantitativas convierte los datos microscópicos en información estructural confiable es una parte importante de cualquier investigación biológica. Esta información se refiere a los patrones, formas, contornos y relaciones de objetos que se hacen visibles por su masa, como por tinción o por una técnica computacional aplicada a una muestra biológica. La fiabilidad de la interpretación depende del análisis estadístico de múltiples imágenes de la misma estructura. Se debe tener en cuenta que en los últimos años se han logrado grandes avances en la capacidad de analizar múltiples imágenes cuantitativamente, debido a la facilidad de adquirir imágenes en formatos digitales y analizarlas por medio de software (Bearer, 2003).

En este numeral se abordan los principales pasos de la teoría del procesamiento digital de imágenes que se utilizarán en esta investigación (Figura 4.21), los cuales son adquisición de imagen, preprocesamiento y procesamiento de imagen, extracción de características de estas y finalmente métodos de clasificación y evaluación de desempeño de de los métodos.

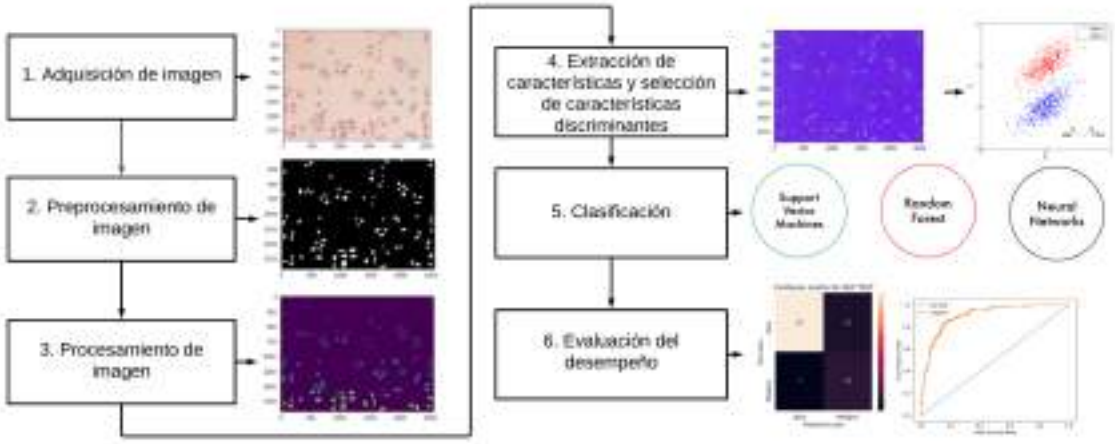


Figura 4.21: Fases generales del procesamiento digital de imágenes.Fuente: Elaboración propia.

4.1.4.1. Adquisición de la imagen

La imagen es captada a través de lentes, mediante sensores especializados como los sensores Charge Coupled Device (CCD) y la convierte en señal eléctrica (Bustamante, 2019). Posteriormente, se produce la digitalización, que convierte la señal eléctrica en datos de información que representan a la imagen, se realiza un muestreo, que representa las muestras de amplitud de la señal eléctrica (Bustamante, 2019). Luego se produce el proceso de codificación, el cual consiste en asignar a estos niveles de amplitud, valores binarios, es decir en un pixel, siguiente a esto, la digitalización separa la cantidad de datos en forma ordenada y que construye la matriz que representa a la imagen para posteriormente ser ingresada a la unidad de procesamiento (Bustamante, 2019).

4.1.4.1.1 Imagen digital

Se define como una función en dos dimensiones f (x, y), donde x, y son coordenadas espaciales y f es la amplitud en el punto (x, y) conocida como la intensidad de la imagen en este (Olanchea, 2015). A cada punto (x, y) se le conoce como píxel, y es el término más utilizado para denotar un elemento de una imagen. Tanto las coordenadas x, y, como la amplitud de la función f son valores finitos (Olanchea, 2015).

4.1.4.1.2 Vecindad

Se le llama a la relación que existe entre un píxel y los píxeles más cercanos a él, los cuales dependen del mallado considerado en el momento del proceso de digitalización de la imagen (Viera, 2017). En un

mallado cuadrangular, un píxel p con coordenadas (X,Y) tiene cuatro vecinos denotados por N4 (p), cuyas coordenadas son (X+1,Y), (X-1, Y), (X,Y+1), (X,Y-1) (Viera, 2017). Y la vecindad 8-vecinos se constituye de los píxeles (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8) correspondientes a los 4-vecinos más los 4 píxeles diagonales del píxel p (Figura 4.22) (Viera, 2017).

Figura 4.22: Vecindad de píxel con vecindad de 4 píxeles y con vecindad de 8 píxeles. Fuente: Viera, 2017.

4.1.4.2. Pre-procesamiento de la imagen

Este proceso incluye conversión de imagen escala de grises, filtrado de ruido, transformaciones morfológicas como:

- Dilatación: Genera que el objeto en la imagen aumente en área, el factor en que crece depende de la forma del elemento y la cantidad de iteraciones en las que se aplique (Srisha & Khan, 2013).
- Erosión: Es una operación complementaria a la dilatación, y genera que el objeto pierda su tamaño (Srisha & Khan, 2013).

El objetivo principal de este paso es eliminar los problemas no deseados y preparar las imágenes para los siguientes pasos de procesamiento (Chy & Rahaman, 2019).

4.1.4.3. Segmentación

La segmentación es una técnica de procesamiento de imágenes la cual subdivide una imagen en los elementos que la constituyen para ser separadas en los elementos y objetos de interés. La segmentación se puede dar de diferentes formas dependiendo del enfoque que se le desee dar (Peña, Silva & Alcolea, 2016).

4.1.4.3.1 Segmentación por umbralización: Otsu

Técnica para realizar segmentación por medio del histograma en escala de grises de la imagen, siendo el eje X el nivel en la escala de grises que se presenta en el pixel y en el eje Y presenta la frecuencia con la cual aparece dicho color dentro de la imagen. A partir de esto selecciona el umbral óptimo maximizando la varianza entre clases mediante una búsqueda exhaustiva como se ve en la figura 4.23 , para poder hacer la diferenciación entre los elementos que se encuentren dentro de la imagen (Bustamante, 2019). :

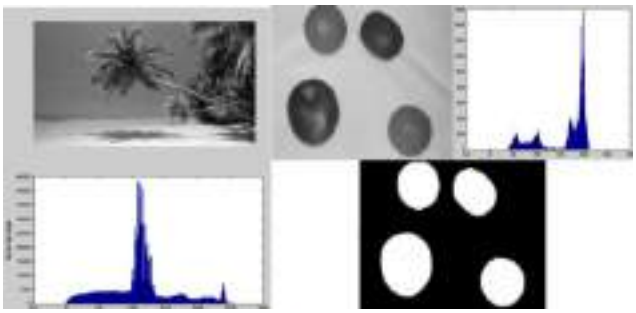


Figura 4.23: Técnica de histograma para contraste (izquierda) y Otsu (derecha). Fuente: Bustamante, 2019.

4.1.4.4. Watershed

La técnica watershed o en español división por líneas de agua es una técnica de segmentación que permite extraer las regiones fronterizas (contornos) que utiliza morfología matemática, clasificación de pixeles, gradientes de gris y homogeneidad de texturas. Esta técnica genera un mapa topográfico con cada pixel de la imagen donde detecta mínimos locales y máximos locales basándose en el gradiente que se presenta (Palomino et al., 2010), como se ve en la siguiente figura:

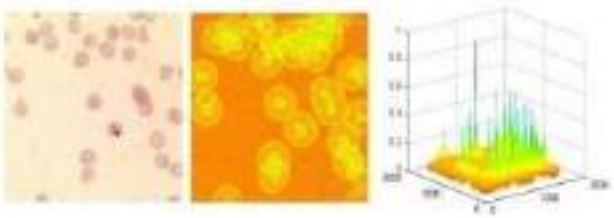


Figura 4.24: Técnica watershed utilizada en globos rojos. Fuente:González, Rodríguez & Orozco, 2017.

4.1.4.5. Extracción de características

Son valores representativos de las imágenes que permiten la identificación de patrones entre ellas para un posterior agrupamiento (Kalinin et al., 2018).

4.1.4.5.1 Morfológicas

Son valores que describen la forma de un objeto y su similitud a valores parametrizables, como figuras geométricas ya descritas. Normalmente se emplean sobre imágenes a blanco y negro, donde la región blanca denotan la sección de interés extraída por medio de un proceso de segmentación (Kalinin et al., 2018).

- Área: Cantidad de pixeles de que conforman un objeto en la imagen (Wirth, 2004).
- Excentricidad: La excentricidad es la relación entre la longitud del eje menor a la longitud del eje mayor de un objeto, el resultado es dado como un valor entre 0 y 1 (Wirth, 2004).

4.1.4.5.2 Modelos de color

Son aquellos que proporcionan una especificación de los colores para establecer un estándar, utilizando un sistema de coordenadas en tres dimensiones, en donde cada color es representado por un píxel (Olanchea, 2015).

- Modelo RGB: Este modelo utiliza las componentes espectrales primarias rojo, verde y azul, así como un sistema de coordenadas cartesianas. El subespacio de este se representa mediante el tetraedro, en donde los colores RGB se sitúan en cada uno de los ejes, y los colores magenta, cyan y amarillo en los vértices restante (Figura 4.25) (Olanchea, 2015).

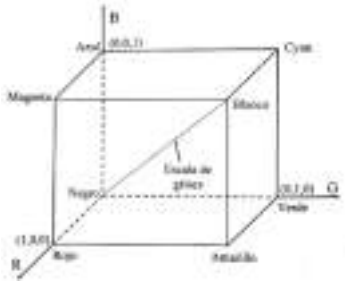


Figura 4.25: Tetraedro de color RGB. Fuente: Olanchea, 2015.

El proceso de conversión a niveles de gris consiste en calcular el promedio de los valores de intensidad de las tres componentes (R, G, B). Cada valor calculado se redondea para formar una nueva matriz con valores de intensidad que pueden estar en el rango de (0-255) (Olanchea, 2015). Se utiliza la fórmula:

$$I = \left(Round \frac{1}{3} (R + G + B) \right) \tag{4.1}$$

- Modelo HSV: Es una transformación no lineal del modelo RGB en coordenadas cilíndricas (Figura 4.26), en donde (Olanchea, 2015). En el cual H (matiz), representa un ángulo en grados con valores entre 0 y 360 grados, en donde cada valor corresponde a un color. Por otra parte S (saturación), representa la distancia al eje del brillo negro/blanco, tiene valores posibles de 0 a 100 %, y representa la pureza del color y finalmente V (valor), representa la altura en el eje blanco a negro, con el rango de valores posibles están entre 0 y 100 (Olanchea, 2015).

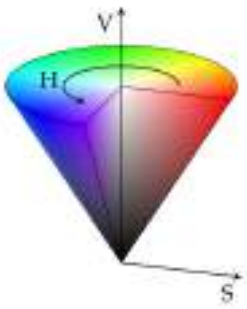


Figura 4.26: Representación gráfica de modelo HVS. Fuente: Morais, 2015.

- Modelo YCrCb: Es un espacio de color construido a partir de una suma ponderada de valores RGB. En el cual se almacena la información de luminancia (Y), y la información de crominancia se almacena como dos componentes de diferencia de color (Cb) que representa la diferencia entre el componente azul y el valor de referencia y (Cr) que representa la diferencia entre el componente rojo y un valor de referencia (Kolkur, Kalbande, Shimpi, Bapat & Jatakia, 2017). Se ve representado por la siguiente imagen:

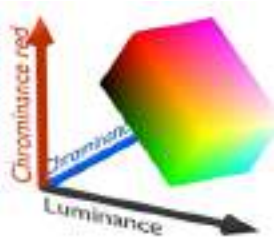


Figura 4.27: Representación gráfica de modelo YCrCb. Fuente: Kolkuret al., 2017.

Los valores YCbCr pueden obtenerse del espacio de color RGB según las ecuaciones representadas en la figura 4.28

$$Y = 0.299R + 0.287G + 0.11B$$
$$Cr = R - Y$$
$$Cb = B - Y$$

Figura 4.28: Conversión de RGB a YCrCb. Fuente: Kolkuret al., 2017.

- Modelo XYZ: Fue creado por la organización internacional comisión de iluminación de 1931. Está definido de tal manera que todos los visibles los colores pueden ser definidos usando sólo valores positivos, y, el valor Y es la luminancia (Figura 4.29) (Ford & Roberts, 1998; Ibraheem, Hasan, Khan & Mishra, 2012; Rahimzadeganasl & Sertel, 2017).

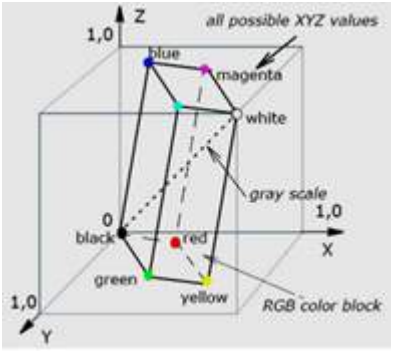


Figura 4.29: Representación gráfica de modelo XYZ. Fuente: Ibraheem, 2012.

Para convertir de espacio RGB a XYZ se emplea la siguiente ecuación:

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2.768892 & 1.751748 & 1.130160 \\ 1.000000 & 4.590700 & 0.060100 \\ 0 & 0.056508 & 5.597292 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

Figura 4.30: Conversión de RGB a XYZ. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017.

- Modelo LUV: Es el primer modelo de color no lineal derivado del espacio XYZ (Figura 4.31), propuesto en 1976. Sus siglas traducen a Luminosidad (L) , Saturación (U) y Ángulo de luminosidad (V) además de esto los vectores U y V están relacionados a la crominancia de la imagen (Ford & Roberts, 1998; Ibraheem et al., 2012; Rahimzadeganasl & Sertel, 2017).

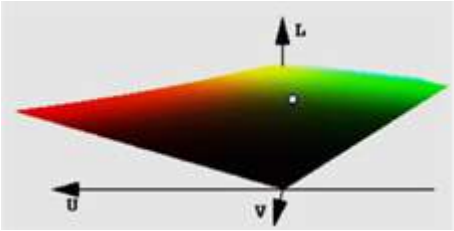


Figura 4.31: Representación gráfica de modelo LUV. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017.

- Modelo LAB: Es el segundo modelo de color uniforme derivado del espacio XYZ, propuesto en 1976, con punto de referencia en el eje blanco a negro. Este espacio determina el color de acuerdo a la posición en tres dimensiones, los componentes (L) es la luminosidad del color en un rango de 0 a 100. Siguiente a esto el componente (A) es en el cual es positivo para los valores indican rojo y negativo para los valores que indican verde, finalmente el componente (B) contiene los valores positivos indican amarillo mientras que los valores negativos indican azul, como se ilustra en la figura 4.32 (Ford & Roberts, 1998; Ibraheem et al., 2012; Rahimzadeganasl & Sertel, 2017).

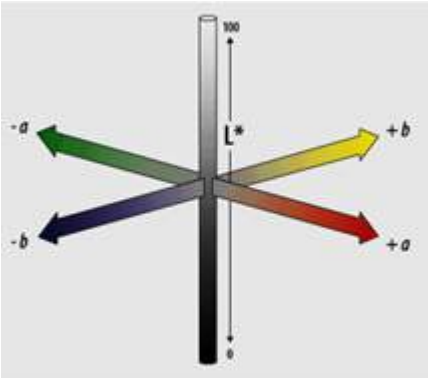


Figura 4.32: Representación gráfica de modelo LAB. Fuente: Rahimzadeganasl & Sertel, 2017.

4.1.4.6. Selección de características

En esta etapa se realiza la selección de las características discriminantes entre las clases reconocidas, con el fin de ingresarlas a las diferentes arquitecturas de clasificación.

4.1.4.6.1 Análisis de componentes principales (PCA)

Es un método de reducción de variables por medio de un análisis estadístico de los datos de entrada. En el cual se realiza una transformación ortogonal que permite obtener un conjunto de nuevas variables no correlacionadas (Serna, 2017).

Por tanto se emplea un análisis espectral de la matriz de covarianza de *x, Cx*. La cual, admite una descomposición en autovalores y autovectores de la forma $\lambda kvk = Cxvk$. En la que los autovalores λk, indican la dispersión o energía asociada a la dirección dada por su correspondiente autovector y son valores reales y mayores o iguales que cero (Debido a que toda matriz de covarianza es semidefinida positiva) (Leiva,2007).

Donde λ = diag ($\lambda 1, \lambda 2, \ldots, \lambda D$) y V = v1, v2, $\cdots$, vD, que tiene la propiedad de proporcionar un conjunto de variables normalizadas y decorrelacionadas (Leiva,2007).

Es decir, la representación de un vector x sobre los D autovectores asociados a los autovalores de mayor energía es la de menor error de reconstrucción de entre todas las trasformaciones que se pueden realizar en diferentes dimensiones (Leiva,2007).

Además, el primer componente principal se caracteriza por tener la mayor varianza en los datos, teniendo en cuenta la magnitud y la dirección de los coeficientes de las variables originales, y a partir de esto, entre mayor sea el valor absoluto del coeficiente calculado, la variable correspondiente tendrá mayor importancia en el cálculo del componente (Leiva,2007).

4.1.4.6.2 Eliminación de características recursivas (RFE)

Este método se utiliza comúnmente para la selección de características que son más informativas en la clasificación o regresión de datos (Chen, Meng, Liu, Jin, & Su, 2018). En el cual, el criterio para eliminar una variable es su incidencia en el margen, es decir que elimina la variable cuya ausencia no altera el valor del nuevo margen(Leiva,2007).

Por medio de este procedimiento, se elabora una selección de acuerdo a la correspondiente exactitud que genera cada característica al método (Chen et al., 2018). El pseudocódigo de esté algoritmo se puede ver representado de la siguiente forma:

Figura 4.33: Psecudocódigo de RFE. Fuente: Granitto, Furlanello, Biasioli & Gasperi, 2006

Por tanto, el algoritmo clasifica las características por importancia, descartando las características menos importantes y reajustando el modelo hasta obtener el subconjunto de mayor exactitud (Chen et al., 2018).

4.1.4.6.3 Búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS)

Este método se basa en una búsqueda secuencial del subconjunto óptimo de características agregando una característica única o una pequeña cantidad de características a la vez hasta que se cumplan los criterios especificados, en este caso los que separen de mejor forma las clases, por tanto el SFFS comienza con un vector vacío y se acumula sucesivamente hasta lograr la matriz que contenga el subconjunto de características deseado (Peng, Wu & Jiang, 2010).

Por lo cual, teniendo un conjunto $Y = (yj|j = 1, ..., D)$ de D características, el algoritmo debe seleccionar un subconjunto $X \subset Y$ de tamaño k ($k < D$) .

$$J(Xk) = max(J(Z))_{Z \subset Y, |Z|=k} \tag{4.2}$$

Y así formar el conjunto $Xk = (xj|j = 1, ..., k, xj \in Y)$ que optimice la función criterio J(Xk) correspondiente (Violini, 2014).

4.1.4.7. Modelos de predicción y clasificación

Los modelos de predicción de aprendizaje automático se utilizan diferentes áreas de procesamiento de datos biomédicos para procesos de diagnóstico y pronóstico (Peng et al., 2010).

Son construidos a partir del entrenamiento con datos adquiridos de casos reales. En esta investigación se emplearon tres diferentes modelos de predicción y se comparó su desempeño para la clasificación de células no infectadas e infectadas con Dengue en una imagen.

4.1.4.7.1 Máquina de soporte vectorial (SVM)

El SVM es un algoritmo de aprendizaje automático supervisado que es empleado normalmente para clasificación lineal de forma binarizada esta metodología es llamada "hard-margin SVM", aunque también es empleado para la clasificación no lineal "soft-margin SVM". (Kavitha, Gopinath, & Gopi, 2017). En este método se intenta encontrar los hiperplanos que producen la mayor separación entre los valores de la función de decisión para las instancias ubicadas en el límite entre dos clases (Peng et al., 2010). Este algoritmo esta dado por la siguiente ecuación:

$$f(x) = sign(W^T X + b) \tag{4.3}$$

Donde:

$$sign(a) = +1(-1) \tag{4.4}$$

W y b son parámetros de aprendizaje que especifican la posición del hiperplano. Siendo w la orientación de este hiperplano y b el desplazamiento de este (Nuñez, Angulo, & Catala, 2002).

Se ve representado por medio de la siguiente figura:

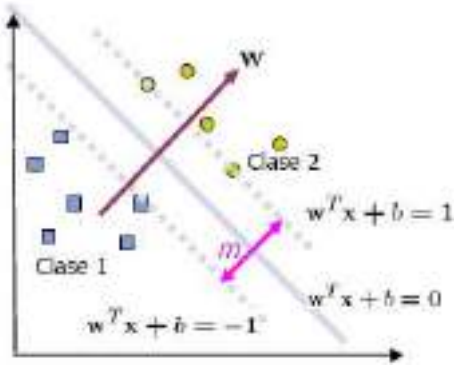


Figura 4.34: Representación gráfica de SVM. Fuente: https://cutt.ly/dgKaxkr

4.1.4.7.2 Bosques Aleatorios (RF)

Los bosques aleatorios, conocidos normalmente como Random Forest (RF), son un tipo de algoritmo de aprendizaje automático supervisado que divide repetidamente el conjunto de datos de acuerdo con un criterio que maximiza la separación de los datos, lo que da como resultado una estructura en forma de árbol (Dreiseitl & Ohno-Machado, 2002). En esta técnica, en cada nodo del árbol, se selecciona un subconjunto de características aleatorias de tamaño fijo y la característica que produce la máxima disminución del índice de Gini (GI) se elige para la predicción. Para calcular este índice se debe realizar la siguiente ecuación:

$$Gini = P^2 + Q^2 \tag{4.5}$$

Finalmente, para predecir la clase de la muestra, se calculan los votos recibidos por cada clase y se asigna la clase que tiene la mayoría de los votos (Gupta & Bhavsar, 2017).

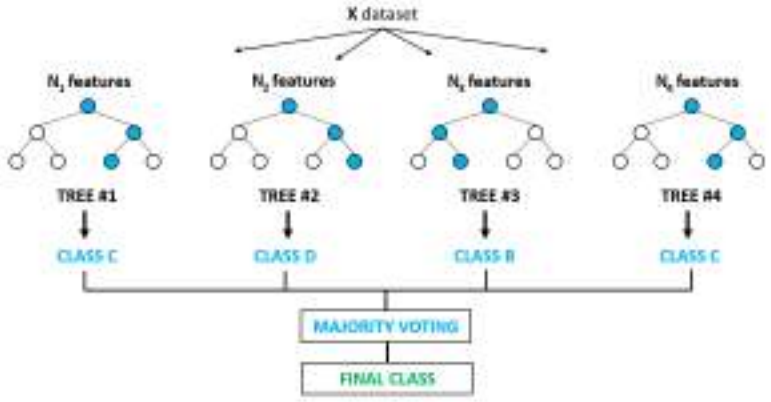


Figura 4.35: Representación gráfica de Random Forest. Fuente: https://cutt.ly/pgK3zBu

4.1.4.7.3 Red Neuronal (NN)

Las redes neuronales son un algoritmo de aprendizaje automático supervisado, que permite establecer una relación entre entradas y salidas. Están basadas en un grupo de unidades funcionales simples,

en este caso neuronas, llamadas así como una analogía al componente funcional del cerebro humano. Cada unidad neuronal, opera de forma individual empleando funciones de suma y son entrenados para que de esta forma al aumentar la cantidad de iteraciones, se programen a sí mismos, en lugar de ser programados de forma explícita, lo que genera que sea utilizado con el objetivo de resolver problemas complejos y con la capacidad de realizar predicciones en sistemas relacionales no lineales (Serna, 2017).

En una red neuronal se tiene un conjunto de entrada que esta dado por $X_j(t)$, cada parte de la red neuronal tiene un peso sinaptico representado por la letra w_{ij}, estas redes contienen una regla de propagación dada por la ecuación (Lopez et al., 2008):

$$h_i(t) = \sum w_{ij} X_j \tag{4.6}$$

Y por ultimo se tiene una función de activación que representa la salida de la neurona y esta dada por la siguiente ecuación (Lopez et al., 2008):

$$y_i(t) = f_i(h_i(t)) \tag{4.7}$$

Realizando un poco de matemática con las ecuaciones anteriores se obtiene que:

$$y_i(t) = f_i(\sum_{j=0}^{n} w_{ij} X_j - \theta_i) \tag{4.8}$$

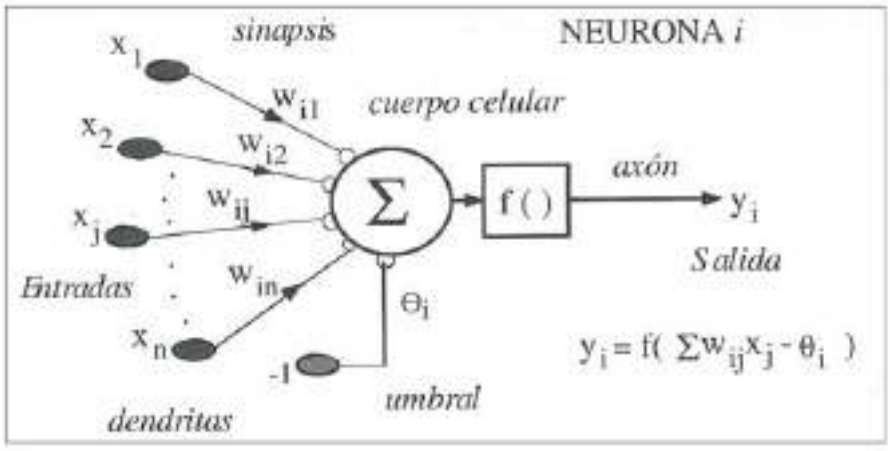


Figura 4.36: Modelo de red neuronal. Fuente: https://cutt.ly/5gKaGVI

Las redes neuronales pueden ser clasificadas dependiendo de su estructura de capas, flujo de datos y respuesta que genera.

La clasificación que se da para estas redes con relación a su estructura por capas es de ser monocapa lo que indica que la red esta compuesta por una sola capa de neuronas o multicapa lo que indica que la red esta compuesta por mas de una capa de neuronas (Lopez et al., 2008).

Para la clasificación por flujo de datos se puede dar unidireccional siendo solo una propagación hacia un sentido o con propagación hacia atrás lo que quiere decir que el flujo de datos se da desde la salida hasta la entrada (Lopez et al., 2008).

Por último la clasificación por respuesta se da con redes heteroasociativas lo que quiere decir que a determinado patrón se tiene una respuesta diferente o autoasociativas ya que así se se asocie un patrón

independientemente de las perturbaciones siempre se tendrá la respuesta el mismo patrón (Lopez et al., 2008).

4.1.4.7.4 Regresión logística (LG)

La regresión logística es un método de análisis estadístico multivariado, empleado para predicción y explicación (Chitarroni, 2002). Es un modelo aplicable cuando la variable de interés (VI) es categórica, por lo que en lugar de construir un modelo de regresión para estimar los valores reales de esta, se plantea una función basada en el cálculo de la probabilidad de que la VI adopte el valor del evento previamente definido, se ve representado en la siguiente ecuación (Pelaez, 2006):

$$Y = ln(p/(1-p)) \tag{4.9}$$

Tras realizar una serie de transformaciones matemáticas se pude deducir que (Pelaez, 2006):

$$p = \frac{L}{1 + e^{-modeloderegresion}} + b \tag{4.10}$$

En la cual,
L=Valor máximo de la curva.
b=Punto de corte con el eje y.
Teniendo en cuenta que el modelo de regresión está representado por la ecuación (Pelaez, 2006):

$$Modeloderegresion = k * (x - x0) \tag{4.11}$$

Donde,
k= Tasa de crecimiento o pendiente de la curva.
x0= El valor x del punto medio de la curva.

Finalmente, al entrenar el modelo se obtiene una curva sigmoidea en la cual se presenta la probabilidad de que ocurra un evento o no, es decir, la variable de interés clasificada bajo un valor de 0 o 1 (Chitarroni, 2002).

4.1.4.8. Índices de evaluación de desempeño

La clasificación se evalúa utilizando métricas numéricas, las cuales pueden ser:

4.1.4.8.1 Matriz de confusión

Esta matriz se conforma a partir la clasificación de los datos de prueba en el clasificador como verdaderos positivos (TP), que son muestras que se han clasificado correctamente como positivas, verdaderos negativos (VN), que son muestras que se han clasificado correctamente como negativas; falsos positivos (FP), que son muestras que se han clasificado incorrectamente como positivas y falsos negativos (FN), que son muestras que se han clasificado incorrectamente como negativas (Abbas, Banks, Chandran, Tomeo-Reyes & Nguyen, 2018).

A partir de estos valores se obtienen características de precisión, exactitud o una representación gráfica del rendimiento, como una curva de características operativas del receptor (ROC), con los valores de sensibilidad y especificidad (Abbas et al., 2018).

La precisión y la exactitud (Accuracy) son las medidas de rendimiento más popular (Abbas et al., 2018).

4.1.4.8.2 F1-Score

El valor F1 se utiliza para combinar las medidas de precisión y sensibilidad en un sólo valor, lo cual permite determinar el rendimiento de un método. Se calcula haciendo la media armónica entre la precisión y la sensibilidad 4.12.

$$F1 = 2 * \frac{Precision * Sensibilidad}{Precision + Sensibilidad} \tag{4.12}$$

4.1.4.8.3 Matriz de correlación

La matriz de correlación demuestra la forma en la que se encuentran relacionadas cada una de las variables con otra variable. Su diagonal siempre contendrá el valor de 1. Si tiene un valor 0, indica que no tiene ninguna relación lineal con la variable (Ferré, 2009).

4.1.4.8.4 ROC

La gráfica de curva ROC relaciona la sensibilidad y 1-especificidad halladas a partir de la matriz de confusión como resultado de desempeño de un clasificador, en donde ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1. El modelo de clasificación ideal presenta un valor de AUC, es decir area bajo la curva ROC de 1 (Cerda & Cifuentes, 2012).

4.2. **Estado del Arte**

Actualmente no se encuentran documentos en los que se describa un método de visión de máquina para cuantificación de títulos de anticuerpos por medio de un prototipo, sin embargo, si se han realizado tesis y artículos sobre conteo de células por medio de procesamiento de imágenes, por otra parte de dispositivos como alternativa a la citometría de flujo y por último de cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes por medio de equipos de laboratorio.

4.2.1. Algoritmos realizados para cuantificación de células.

El diseño de un algoritmo para la automatización del conteo de células del tejido sanguíneo mediante procesamiento digital de imágenes, de Rafael Bustamante Álvarez (2019), se basa en un algoritmo para el conteo de células sanguíneas en cámara de Neubauer, específicamente el conteo glóbulos rojos y conteo diferenciado de glóbulos blancos, mediante el procesamiento digital de imágenes, basado en dos algoritmos propuestos para cada caso respectivamente. El primero, mediante el método de la estimación de áreas y el segundo, para el conteo diferenciado de glóbulos blancos por medio del método máximos y mínimos, es decir que el procedimiento identifica, clasifica y cuenta según el tipo de glóbulo blanco o leucocito.

El algoritmo realizado sigue la secuencia de: Captación de la imagen, mejora de la imagen por medio de paso a escala de grises y ecualización por histograma umbralización de la imagen, negativo y relleno

de agujeros, remoción y relleno de agujeros, dilatación, erosión y el conteo de células el cual se realiza una vez que se produce la segmentación mediante la transformación de Watershed y la estimación de áreas (Bustamante, 2019).

Para realizar el proceso mencionado, la imagen se captó por una cámara instalada en un microscopio y luego se transmitió a un computador para su análisis y conteo de las células sanguíneas mediante el algoritmo desarrollado. De esta manera se automatizó un proceso manual para ahorrar tiempo y evitar la fatiga, de una tarea repetitiva, como una alternativa al servicio de análisis de sangre en los centros de salud que es muy útil para la investigación y capacitación, en lo referente a identificación y técnicas conteo de células sanguíneas (Bustamante, 2019).

Por otra parte, en el artículo *"Segmentation and Counting of WBCs and RBCs from Microscopic Blood Sample Images"* de Lata A. Bhavnani, Udesang K. Jaliya y Mahasweta J. Joshi (2016), se quiso proponer un método de segmentación y recuento de células sanguíneas automatizado para el diagnóstico precoz de enfermedades por medio de procesamiento de imágenes. Se realizó un algoritmo en el cual la entrada es la imagen RGB de la muestra de sangre microscópica. Luego la convierte a una imagen en una escala de grises, y solo el componente verde del RGB la imagen se tomó para su posterior procesamiento porque el componente verde destaca las células sanguíneas correctamente para aplicar fácilmente el umbral para diferentes células sanguíneas. En el siguiente paso, el umbral de Otsu se usa para extraer células sanguíneas. Después se realizó un estudio de un histograma de 20 imágenes, para obtener el valor de intensidad aplicado 90 para WBC (White blood cells) y 210 para RBC (Red blood cells). Los pasos de preprocesamiento implican operaciones morfológicas como erosión, dilatación, apertura y cierre. La detección de borde se realizó utilizando la detección de borde canny y se realizó el preprocesamiento para WBC y RBC respectivamente. El último paso es contar las células sanguíneas (Bhavnani, Jaliya & Joshi, 2016).

El conteo de WBC se realizó contando una cantidad de los componentes conectados y el recuento de glóbulos rojos (RBC) fue realizado utilizando la segmentación de cuencas hidrográficas y la transformada Hough circular. La cual identificó solo puntos bajos que complementa la imagen para que los picos se vuelvan valles. Por último, modificó la imagen de modo que el fondo píxeles y los píxeles máximos extendidos se convierten en los únicos mínimos locales en la imagen. La metodología obtuvo un 90 % de precisión, lo que puede ser útil para detectar un recuento de células sanguíneas así sea en cantidades bajas (Bhavnani et al., 2016).

En el artículo *"Gray level co-occurrence matrix and random forest based acute lymphoblastic leukemia detection"* de Sonali Mishra, Banshidhar Majhi, Pankaj Kumar Sa y Lokesh Sharma (2016), se quiso proponer un método de estrategia de detección de leucemia linfoblástica aguda a partir de imágenes microscópicas por medio de procesamiento de imágenes.

Se realizó un algoritmo en el cual se basó en 6 principales pasos: 1) adquisición de imágenes, 2) preprocesamiento de imágenes, 3) segmentación, 4) extracción de características y representaciones, 5) clasificación de células, y 6) el proceso de evaluación (Mishra, Majhi, Sa & Sharma, 2017).

Como primera parte las imágenes fueron tomadas del dataset ALL-IDB1 creado a partir de muestras del Centro de Investigación de la Leucemia Infantil y Enfermedades Matemáticas de M.Tettamanti, en Monza, Italia (Mishra et al., 2017). En cuanto al preprocesamiento se utilizó una ecualización mediante el histograma para encontrar la región de interés (núcleo y citoplasma) y se utilizó un filtro de Weiner. Por tanto se tomaron imágenes en las que se segmentaron solo los nucleso y otras en las que se sgmentaron solo los citoplasmas (Mishra et al., 2017).

Posteriormente, se aplicó una transformación de intensidad mediante el uso de umbrales para mantener solo los glóbulos blancos sobre un fondo en una imagen binaria y se eliminaron posibles

manchas o ruido en la imagen a través de cálculo de valores de solidez en esta (Mishra et al., 2017).

Para la extracción de características se empleó la GLCM (Matriz de co-ocurrencia de nivel gris) para calcular las características en la imagen de entrada, y de esta forma se realizó un análisis probabilístico PCA para mantener las características relevantes, para finalmente realizar el entrenamiento del método de clasificación Random Forest (Mishra et al., 2017).

La metodología obtuvo un 99 % de precisión al emplear las imágenes en las que se segmentó el núcleo y presentó un 96 % al emplear las imágenes del citoplasma segmentado. Como mejoras se propuso utilizar otras características de color y morfológicas para mejorar el rendimiento, y emplear conjunto de datos más amplio (Mishra et al., 2017).

En el artículo *"Detection and Classification of Blood Cancer from Microscopic Cell Images Using SVM KNN and NN Classifier"*, escrito por Sachin Paswan y Yogesh Kumar Rathore en 2017 describen un método de clasificación automático de células sanguíneas con leucemia en imágenes microscópicas empleado dos modelos de clasificación.

Las imágenes empeladas fueron adquiridas de 100 muestras de laboratorio y cargadas en MATLAB con un tamaño de $512 * 512$. Como primera parte para el preprocesamiento se convirtió la imagen al espacio de color LAB y se realizó un filtro gaussiano. Posteriormente se dentificó el área de conteo, se realizó la normalización del color en la imagen (Paswan & Kumar, 2017).

Además de que se separaron los glóbulos blancos de la imagen realizando una segmentación de la imagen. Con la finalidad de especificar y extraer la ROI (región de interés), para la segmentación se empleó la técnica de umbralización en espacio de colores (Paswan & Kumar, 2017).

Siguiente se realizó la extracción de características de la imagen en las cuales se tuvo en cuenta la dimensión Hausdorff, la coincidencia de niveles de grises (GLCM) y características de forma, textura como lo son energía, homogeneidad, entropía, segundo momento angular, correlación y contraste. Por medio de la conversión de la imagen a espacios RGB y HSV. Se realizó la elección de características por categorías ALL, SFFS y AML (Paswan & Kumar, 2017).

Para la clasificación se empelaron tres métodos SVM, NN y KNN, sin embargo se eligió el método de SVM debido que presentó un valor de exactitud de 83,3 % mayor a KNN (61,11 %) y NN (72.59 %).

Por último, en el artículo *" Development of automatic classification system for leukocyte images using Random Forest"* de Shinnosuke Tomiyama Mamiko Sakata - Yanagimoto Shigeru Chiba Naoyuki Aikawa (2018), se quiso proponer un método para la clasificación de leucocitos en imágenes microscópicas por medio de procesamiento de imágenes.

En este algoritmo para el preprocesamiento de la imagen se realizó un preprocesamiento por medio de histogramas y de ortonormalización de Gram-Schmidt con la finalidad de extraer el área del citoplasma celular y del núcleo. Una vez separados estos componentes en la imagen se procede a calcular el vector de características (Tomiyama, Sakata-Yanagimoto, Chiba & Aikawa, 2018).

Se debe tener en cuenta que el método convencional empleado para conteo de WBC según bibliografía se basa en obtener 18 características de las cuales 10 son de color y 8 son geométricas. Por tanto, en el artículo proponen la adición de nuevos vectores de características para mejorar la precisión de clasificación de las células, específicamente la excentricidad del centro de gravedad del núcleo y la distribución de gránulos en la célula (Tomiyama et al., 2018). Posteriormente se realizó una evaluación de las características con la finalidad de determinar la prioridad al clasificar entre las 10 diferentes clases de leucocitos. Para el proceso de clasificación emplearon dos metodologías SVM (Máquina de

soporte vectorial) como control del proceso y Random Forest (Tomiyama et al., 2018).

Finalmente, el método de Random Forest presentó una precisión del 70 %, debido a que los vectores característicos propuestos no fueron eficaces para clasificar promielocitos y mielocitos (Dos de las diez clases de leucocitos) y además de que no hubo diferencia observable en la distribución de gránulos entre las clases de promielocitos y mielocitos (Dos de las diez clases de leucocitos), por tanto se propone la búsqueda de características discriminantes para estas cuatro clases (Tomiyama et al., 2018).

4.2.2. Estudios sobre Prototipos como alternativas a citometría de flujo.

En el artículo *"An inexpensive, customizable microscopy system for the automated quantification and characterization of multiple adherent cell types"*, desarrollado por Vishwaratn Asthana, Yuqi Tang, Adam Ferguson, Pallavi Bugga , entre otros (2019), se buscó realizar diseñar un citómetro robusto, de bajo costo y automatizado basado en microscopía que cuantifica las células individuales en una placa de pocillos múltiples utilizando herramientas fácilmente disponibles en la mayoría de los laboratorios, debido a que, muchos ensayos de cuantificación disponibles actualmente, incluidos la citometría de flujo y los sistemas comerciales de recuento de células, presentan inconvenientes únicos que limitan su eficacia general.

Debido a esto, a partir de herramientas disponibles en la mayoría de los laboratorios, crearon una configuración de conteo óptico para la cuantificación de múltiples tipos de células adherentes en una placa de pocillos múltiples (Las mismas placas de pocillos múltiples empleadas en PRNT) (Figura 4.37) . Después de colocar las células en placas, se agregó un sustrato de tinción fluorescente DAPI, Vybrant CFDA SE y el anticuerpo anti-CD11b, por lo cual el sistema propuesto requirió de un microscopio fluorescente estándar para capturar imágenes de pozos enteros (Asthana et al., 2018).

En cuanto a la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio fluorescente invertido Nikon Eclipse Ti – E con etapa motorizada x , y , z (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE. UU.), y las imágenes se capturaron con un objetivo NAMC 10 y una cámara Andor Zyla 4.2 sCMOS (Andor Technology, Belfast, Irlanda del Norte) (Asthana et al., 2018).

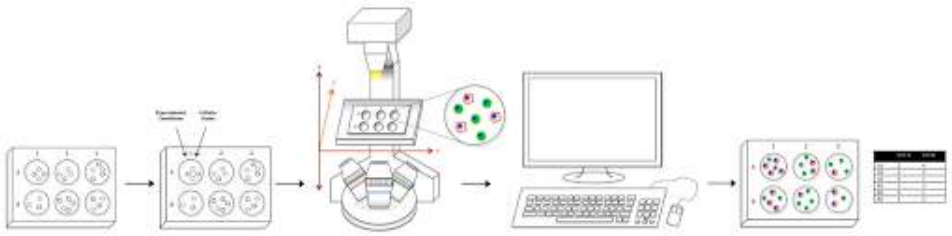


Figura 4.37: Diagrama de flujo del dispositivo diseñado para cuantificación automática de placas en PRNT. Fuente: Asthana et al., 2018.

Para obtener imágenes de las células teñidas se usó el software Nikon asociado, NIS-Elements, se configuró una macro automatizada para la adquisición de pozos completos. Primero, se realizó una lista de coordenadas x - y que delimitó el centro de cada pocillo, siguiente a esto, para abordar las deficiencias de los ensayos de cuantificación tradicionales, realizaron el procesamiento de imágenes con ImageJ y utilizaron técnicas de umbral, contorneado, eliminación de agua, limpieza, erosión, dilatación, apertura, cierre y suavizado para identificar de forma única las células individuales de las muestras utilizadas en las pruebas (Asthana et al., 2018).

Por otra parte, en el siguiente artículo también se quiso realizar un dispositivo de bajo costo, esta vez para el conteo de células sanguíneas, llamado *"A simple and low-cost device performing blood cell counting based on lens-free shadow imaging technique"* realizado por Mohendra Roy, Geonsoo Jin, Dongmin Seo, Myung-Hyun Nam y Sungkyu Seo (2014), sugiere que el conteo sanguíneo completo (CBC) es un procedimiento de diagnóstico básico e importante en laboratorios patológicos, usualmente es realizado por medio de un hemocitómetro, un dispositivo diseñado para el recuento celular que es un proceso que lleva mucho tiempo ya que la identificación y el recuento de células se realizan manualmente. Por lo tanto, este método manual es de bajo rendimiento, genera errores subjetivos del operador y un alto riesgo de infección del operador.

No obstante, existen enfoques automatizados de conteo de células, eléctricos y ópticas basados en la impedancia como la citometría de flujo que proporcionan resultados precisos. Sin embargo estos equipos requieren de alto costo de instrumentación, mantenimiento, y alto nivel de capacitación del operador limitan severamente su uso para la mayoría de los estudios de investigación además de que son de tamaño voluminoso (Roy, Jin, Seo, Nam & Seo, 2014).

El dispositivo creado (Figura 4.38) se basó en un sensor de imagen CMOS sin etiqueta y con lente, que contenía solo de dispositivos optoelectrónicos de bajo costo (es decir, un diodo emisor de luz (LED) conjugado con microagujeros y un sensor de imagen CMOS) y se usó un color azul de longitud de onda máxima de 470 nm como fuente de iluminación para utilizar los patrones de difracción de alto contraste, el costo total de este dispositivo sería insignificante en comparación con un sistema de referencia de citometría de flujo (Roy et al., 2014).

Para la adquisición de la imagen se ubicaron las muestras de células sanguíneas en cámaras de recuento Neubauer, para proporcionar la iluminación semi-coherente, se instaló un orificio de tamaño de 300 $\pm 5\mu$ m (K39-880, Edmund Optics) en la parte superior del LED y para que esta fuera uniforme, la fuente de luz se colocó a la altura de 8 cm de la muestra (Roy et al., 2014).

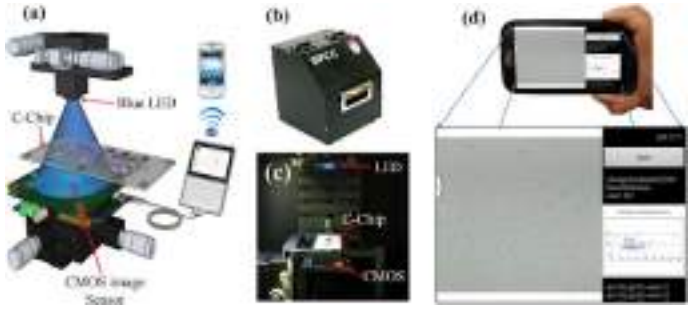


Figura 4.38: Configuración experimental del dispositivo. a.Esquemático del sistema de imágenes de sombras sin lentes. b.Vista externa del dispositivo. c. Vista interna del dispositivo. d. Fotografía e instantánea de la aplicación de teléfono que realiza el recuento de células sanguíneas. Fuente: Roy et al.,2014.

En el cual se realizó un algoritmo que identificaba los objetos mediante la detección de estos parámetros de sombra. Para clasificar los tipos de objeto, se incorporó al algoritmo de detección, el método de agrupación de C-medias, el cual permite que una pieza de datos pertenezca a dos o más agrupaciones, y este algoritmo de agrupación se basa en la minimización de la función objetivo. Los parámetros fueron valor máximo central, ancho del máximo central y distancia de pico a pico (Roy et al., 2014).

Además de esto determinaron que el sistema era capaz de enviar las imágenes de forma inalámbrica

y procesarlas en un teléfono inteligente moderado, por lo tanto, el sistema propuesto presentaba un gran potencial en aplicaciones de telemedicina (Roy et al., 2014).

4.2.3. Estudios sobre comparación entre método PRNT vs Citometría de flujo para determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes.

En el artículo llamado *"Comparison of Plaque-and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization"* de Kraus, Messer, Haymore y de Silva (2007), se menciona que la prueba *estándar de oro* actual para medir la neutralización de los anticuerpos es la prueba de neutralización de reducción de placa (PRNT), sin embargo esta conlleva mucho tiempo y utiliza líneas celulares no humanas, por esto algunas cepas de los aislados clínicos no forman placas y no pueden usarse en PRNT, además de que tampoco es adecuado para la detección de alto rendimiento de grandes cantidades de muestras de suero.

Las alternativas a esta prueba son necesarias debido a que las vacunas contra el dengue ya se están probando en ensayos clínicos, por lo se necesitan ensayos que puedan detectar rápidamente grandes cantidades de muestras de suero para su neutralización de las cepas contemporáneas de DENV (Kraus, Messer, Haymore & de Silva, 2007).

Actualmente, se realizan ensayos basados en citometría de flujo para medir la neutralización mediada por anticuerpos y la inhibición en la infección con DENV. Por lo que en el estudio, se investigó sobre el desarrollo de ensayos basados en placa de 96 pocillos para la medición de la neutralización DENV y en comparación de los ensayos basados en citometría de flujo con el PRNT clásico (Kraus et al., 2007).

En este ensayo se usaron las células de línea celular monocítica humana (U937) que fueron transfectadas de manera estable con DC-SIGN (Factor de unión para DENV), posterior a esto se fijaron y se permeabilizaron usando un kit Cytofix / Cytoperm y se tiñeron con anticuerpo monoclonal 4G2 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Anticuerpo que reconoce la proteína E del flavivirus), posterior a esto, se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (Kraus et al., 2007). Y para hallar la dilución del suero que neutralizó el 50 % de los virus (NEUT50), se calculó mediante un análisis de regresión de respuesta a la dosis no lineal con el software Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)(Kraus et al., 2007).

Como conclusiones se obtuvo que los ensayos de neutralización basados en citometría de flujo ofrecen ventajas significativas sobre PRNT para medir la neutralización de anticuerpos de DENV ya que se tarda un menor tiempo para evaluar los 96 pocillos, sin embargo la variabilidad intraensayo fue alta, especialmente cuando se analizaron las mismas muestras en días diferentes, por lo que se puede demostrar que ambos métodos presentan esta característica, además de esto, como la citometría de flujo requiere un equipo costoso que es difícil de mantener, el ensayo de neutralización basado en citometría de flujo puede ser se realizan sólo en laboratorios seleccionados (Kraus et al., 2007).

Por último, en el articulo llamado *"A GFP Reporter MR766-Based Flow Cytometry Neutralization Test for Rapid Detection of Zika Virus-Neutralizing Antibodies in Serum Specimens"* de Etinne Frumence, Wildriss Viranaicken, Gilles Gadea y Philippe Desprès (2019), se hace una comparación entre dos métodos de cuantificación de anticuerpos neutralizantes en el virus del Zika para para la obtención del título de neutralización 50 del virus .

Se realizaron ensayos para PRNT en los cuales se le suministraba una dosis de suero (Zikbehmr-2) en diferentes diluciones haciendo la medición del número en el cual se realizaba la neutralización 50

del virus obteniendo como resultado un valor de PRNT50 de 130 obteniendo un porcentaje de 95 % de confianza (Frumence, Viranaicken, Gadea & Desprès, 2019).

Una vez obtenidos estos resultados se realizaron ensayos para citometría de flujo en los cuales se realizó el mismo proceso que con PRNT suministrando una dosis de suero (Zikbehmr-2) en diferentes diluciones haciendo la medición del número en el cual se realizaba la neutralización 50 del virus obteniendo un resultado de FNT50 de 117 con un porcentaje de confianza de 95 % (Frumence et al., 2019).

Para la comparación se realizó el gráfico de dispersión (Figura 4.39) de los datos obtenidos y el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, con lo que se pudo establecer que presentó una correlación lineal entre los valores de FNT 50 y PRNT 50 con un coeficiente de determinación de R2 de 0,9 (Frumence et al., 2019). Por lo tanto, se pudo determinar que el FNT basado en ZIKV informador de GFP recientemente desarrollado permite una detección rápida y confiable de anticuerpos neutralizantes de ZIKV en muestras de suero (Frumence et al., 2019).

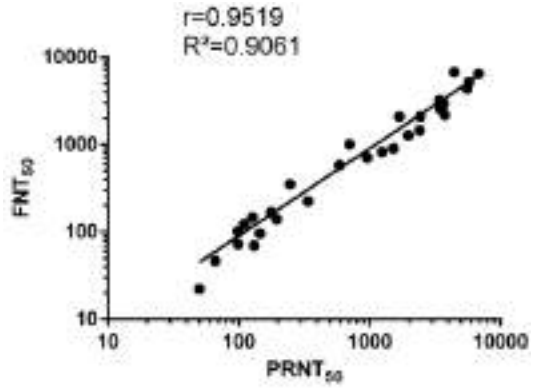


Figura 4.39: Gráficos de dispersión de los valores de PRNT 50 y FNT 50. Fuente: Frumence, Viranaicken, Gadea & Desprès, 2019.

5. LEVANTAMIENTO DE REQUERIMIENTOS

A continuación se demuestran los requerimientos funcionales, técnicos, de restricción y de calidad determinados para el proyecto (Delgado, 2019).

5.1. Funcionales

- El algoritmo debe realizar la cuantificación de células infectadas de forma automática mediante visión de máquina. Con el fin de automatizar el proceso de conteo visual de las células.
- El diseño del prototipo debe contar con un mecanismo que tenga la capacidad de desplazar vertical y horizontalmente la cámara de Neubauer, para que sea posible tomar una foto por cada rejilla.
- El diseño del prototipo debe contar con un dispositivo de captura de imágenes con aumento, con el fin de que se visualicen de mejor forma las células infectadas.
- El algoritmo debe almacenar los valores de neutralización de la muestra en dilución $\frac{1}{10}$ a $\frac{1}{10^6}$, para que sea posible hallar el título de neutralización 50 (Dilución del suero a la que se neutraliza el 50 % de la infección del virus Dengue).
- El algoritmo debe realizar la conversión de porcentaje de células infectadas a título de neutralización 50. Debido a que es el valor que se desea obtener con ayuda del prototipo.
- El dispositivo de toma de imágenes debe enfocar sólo una cuadrícula de la cámara de Neubauer al momento de tomar una de las 10 fotografías que se captan en el proceso. Para evitar conteos inexactos, debido a que cada muestra ubicada en una cuadrícula corresponde a una dilución diferente de la muestra, por lo cual se debe realizar el conteo de las células mediante la rejilla que cada una presenta.
- El diseño del prototipo debe contar con una fuente de luz para iluminar la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer debe estar iluminada para una mejor visualización de las células marcadas con el sustrato, ya que a mayor luz se logrará visualizar de mejor forma el sustrato de marcación de las células infectadas.
- El algoritmo debe ser robusto. Debe presentar el mismo desempeño ante cambios en la imagen, ya sea luminosidad, brillo, etc. El diseño del prototipo a desarrollar debe ser intuitivo para el usuario del laboratorio. Es decir debe ser fácil de usar y entender.
- La muestra debe ser ubicada en una cámara de Neubauer de 10 cuadrículas de recuento y posteriormente colocada en el prototipo, para que sea posible cuantificar las células infectadas de cada dilución desde $\frac{1}{10}$ hasta $\frac{1}{10^6}$ y un control positivo y otro negativo.

5.2. Técnicos

- Se requiere de un dispositivo de captura de imágenes con aumento de 50x a 1000x para la captura de imágenes de microscopía adecuada. Con el fin de obtener una fotografía de aumento de cada cuadrícula de la cámara de Neubauer y lograr visualizar las células de un tamaños de 10 a 30 micrómetros colocadas en las cuadrícula, y por estar en el orden de los micrómetros son imágenes de microscopía (Longo, 2016).

- El algoritmo debe tener un tiempo de análisis y resultados menor al del método de referencia utilizado por el grupo de Virología (Citometría de flujo). Si se disminuye el tiempo de realización de la prueba, se aumenta el número de pruebas a realizar por lo cual ayuda en la cuantificación de NAbs masiva de suero de individuos (Kraus, Messer, Haymore & de Silva, 2007).
- El coeficiente de correlación de Pearson mínimo esperado es de 0,7, entre los resultados del prototipo y el método de referencia (Citometría de flujo). Este valor es aceptado como coeficiente moderado al momento de evaluar correlación en investigación médica (Mukaka, 2012).
- Se deben utilizar de 13 muestras de suero de pacientes para realizar las pruebas de cuantificación, este valor como resultado a partir de cálculo de tamaño de muestra de correlación de Pearson.

  Con el fin de que el resultado obtenido sea un resultado robusto y confiable de acuerdo con los siguientes cálculos realizados en base a correlación de Pearson con la ecuación 5.1, en la cual, para una seguridad del 95 % y un poder estadístico del 80 % se tiene que $z_{1-\frac{\alpha}{2}} = 1{,}96$ y $z_{1-\beta} = 0{,}84$, valores que son establecidos según tablas estadísticas (Pértegas Pitas, 2002).

$$n = \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta}{}^2}{\frac{1}{2}ln(\frac{1+r}{1-r})} \; n = \frac{1{,}96 + 0{,}84{}^2}{\frac{1}{2}ln(\frac{1+0{,}7}{1-0{,}7})} \; n = 13 \tag{5.1}$$

- Se debe realizar el procesamiento de la información por medio de un computador. Este debe ser un computador de procesador INTEL®CORE ™, una memoria RAM de 12GB o mayor, que contenga los módulos de Python de Pandas, Numpy, Scikit-learn, Math, Time y Statistics.
- Bibliotecas (Librerías) para procesamiento de imágenes (OpenCV), que son necesarias para realizar la cuantificación de células infectadas por medio de visión de máquina.

5.3. Restricción

- El prototipo debe ser manipulado únicamente en un laboratorio de investigación. Debido a que las muestras presentan material biológico, además de que la cuantificación de títulos de anticuerpos neutralizantes se realiza solo en laboratorios de investigación no en otro tipo de laboratorio.
- El personal que trabaje con las muestras debe presentar elementos de protección personal (Bata, guantes, gafas, tapabocas, gorro). Ya que se manipula material biológico.
- Disminuir la posible oclusión de células al momento de realizar la cuantificación, para que se disminuya la posibilidad de generar errores al momento de la cuantificación en el procesamiento de imágenes.

5.4. Calidad

- El material del prototipo debe ser resistente al alcohol. Debido a que con esta sustancia se realizará su desinfección. Se deben seguir las normas de seguridad y manipulación de virus establecidas por el Laboratorio de Investigación de la Universidad El Bosque. Ya que se está manipulando material que puede ser nocivo para la salud.
- Las imágenes proporcionadas por el grupo de Virología deben ser de células fijadas y marcadas con sustrato cromogénico DAB. Con el fin de continuar con la propuesta inicial de células marcadas con DAB.

- Las imágenes sintéticas creadas para el dataset deben representar diferentes porcentajes de infección con DENV.
- Las células infectadas elegidas para simular diferentes porcentajes de infección, deben estar presentarse sin oclusión. Para simular de mejor forma las imágenes de células suspendidas en cámara de Neubauer.
- Cada imagen del dataset debe contar con una imagen adjunta y un archivo tipo txt que indique la ubicación de cada una de las células infectadas y no infectadas en la imagen.

6. METODOLOGÍA

El proyecto de grado se dividió en cinco diferentes etapas visualizadas en la siguiente figura:

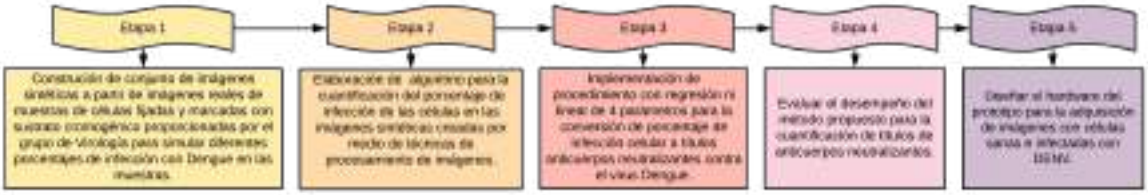


Figura 6.40: Etapas de proyecto de grado. Fuente: Elaboración propia.

6.1. Construcción de conjunto de imágenes sintéticas.

Como primera etapa del proyecto, se realizó la búsqueda de dataset en bancos de imágenes con características similares a las del conjunto de imágenes sintéticas esperado, para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

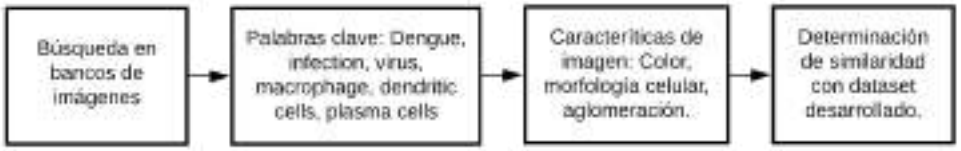


Figura 6.41: Metodología de búsqueda de dataset en bancos de imágenes. Fuente: Elaboración propia.

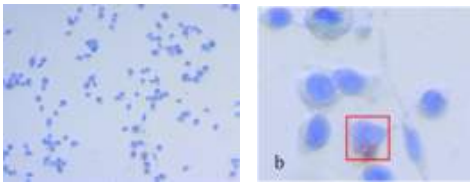
Sin embargo, al no obtener las características esperadas en las imágenes, se planteó la construcción de imágenes sintéticas a partir de imágenes reales otorgadas por el grupo de Virología de la Universidad El Bosque, capturadas con la cámara incorporada al microscopio de referencia Axio Imager.M2, con una magnificación de 400 a 1000 en cada imagen.

Estas imágenes muestran células fijadas no infectadas de color azul y marcadas con sustrato cromogénico, que tras ser infectadas con virus Dengue se tornan de color violeta. Estas actividades se desarrollaron debido a que era necesario ilustrar las células infectadas con sustrato cromogénico DAB y no con fluorocromos como se realizaba en el método de referencia utilizado en el laboratorio de investigación (Citometría de flujo), con el fin de que estos se encontraran en un espectro visible, a diferencia de los fluorocromos que necesitan de rangos de excitación de luz determinados y un procedimiento más elaborado para que sea posible observarlos (Manafi, Kneifel & Bascomb, 1991; Marsán Suárez et al., 2015).

Para la construcción de estas imágenes se realizó la edición de las imágenes mediante dos algoritmos en Python en los que se debe agregar células infectadas a la imagen original para generar una simulación del aumento del porcentaje final de células infectadas.

Para la generación de imágenes sintéticas mediante el algoritmo de Python se realizó la siguiente metodología:

Primero se seleccionó la imagen base a modificar (Figura 6.42a), es decir la imagen que en la que se insertaran nuevas células infectadas, se debe tener en cuenta que esta debía tener alguna célula marcada con color violeta (Figura 6.42b). Seguido de esto se seleccionaron las diferentes células infectada a utilizar las cuales se insertaron en determinada cantidad a la imagen base, como objeto nuevo.



(a) Imagen base. (b) Célula infectada.

Figura 6.42: Imagen seleccionada para editar. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque.

Se eligieron imágenes en las que se encontraran células infectadas (Figura 6.43) sin aglomeraciones con el fin de replicar de la mejor forma la idea inicial el proyecto, basado en células en suspensión ubicadas en cámara de Neubauer, las cuales son empleadas para cuantificar de forma visual células infectadas y no infectadas. Sin embargo, algunas de las células infectadas en las imágenes otorgadas por el grupo de virología se encuentran en aglomeraciones, ya que estas imágenes no son utilizadas para cuantificar sino para cualificar si existe o no infección en la muestra, por lo tanto se deben descartar las imágenes que presentan estas características de aglomeración.

Figura 6.43: Imágenes de células infectadas. Fuente:Grupo de Virología de la Universidad El Bosque.

Una vez seleccionadas las dos imágenes se obtuvo las dimensiones de la imagen de fondo (largo y ancho) para el dimensionamiento de la imagen final, a través de un filtro de muestreo de alta calidad.

Seguido de esto, por medio de la técnica de data aumentation, que traduce al aumento de datos de imagen, empleada para expandir artificialmente el tamaño de un conjunto de datos de entrenamiento mediante la creación de versiones modificadas de imágenes en el conjunto de datos, por lo que de esta forma se modificó el largo, ancho, inclinación y demás características de la célula infectada (Hussain, Gimenez, Yi, & Rubin, 2018; Shorten & Khoshgoftaar, 2019). Se ve representado en la siguiente imagen:

Figura 6.44: Técnica de data aumentation para versiones modificadas de células infectadas. Fuente: Elaboración propia.

Una vez obtenida esta imagen fue superpuesta encima de otra por lo cual se seleccionaron y cargaron las dos imágenes a utilizar en formato PNG. Se ve representado en la siguiente imagen:

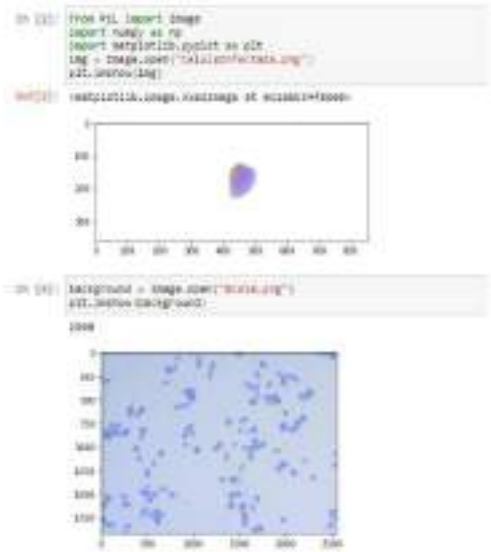


Figura 6.45: Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 1). Fuente: Elaboración propia.

La imagen a insertar (célula infectada) se ubicó en las coordenadas (x,y) dadas por el programador teniendo en cuenta las dimensiones de su imagen background, estas coordenadas fueron elegidas dependiendo la ubicación de una célula no infectada que será superpuesta con una infectada.

En paralelo a esto se aplicó una máscara (opcional) para generar que el objeto pegado en la imagen original presente transparencia y así un mejor resultado final. Se ve representado en la siguiente imagen:

Figura 6.46: Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 2). Fuente: Elaboración propia.

Por último se guardo la imagen resultante como una imagen nueva. Se ve representado en la siguiente imagen:

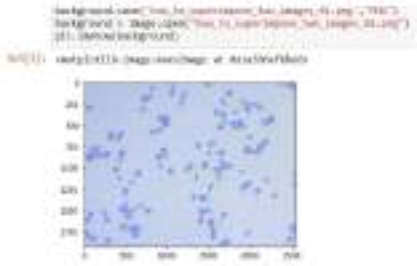


Figura 6.47: Técnica de superposición de células infectadas a imagen base (Parte 3).Fuente: Elaboración propia.

Después de esto, se eliminó de la imagen la cantidad de células no infectadas de acuerdo a la cantidad de células infectadas añadidas, realizando el mismo proceso de superposición de imágenes en donde la imagen a utilizar para eliminar las células es parte del fondo total de la imagen.

El anterior proceso se realizó para generar 10 imágenes a partir de una imagen base, en las cuales se aumenta el porcentaje de infección en un 10 % respectivamente. Es decir : 10 % hasta 90 % de infección. Y se eligen cuatro (4) imágenes base, es decir para generar un total de cuarenta (40) imágenes sintéticas o más.

El siguiente paso que se desarrolló para generar un dataset completo de imágenes fue la señalización tanto de la células infectadas como las no infectadas en cada una de las imágenes sintéticas creadas. Que consistió en delimitar cada una con cuadrados de diferente color, rojo para infectadas y violeta para no infectadas con ayuda de Paint 3D. Se ve representado en la siguiente imagen:

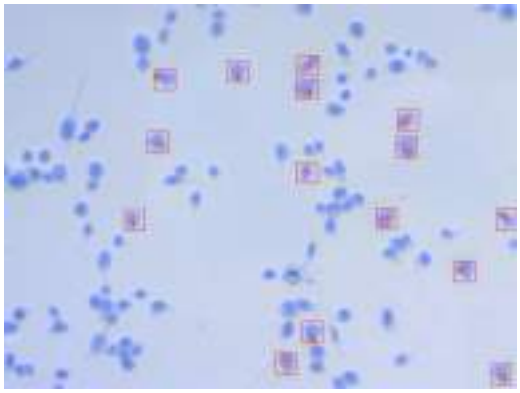


Figura 6.48: Cuadros de delimitación de células en imágenes. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se determino la ubicación de los cuatro píxeles (p1, p2, p3,p4), del cuadro que delimita cada una de las células. Se ve representado en la siguiente imagen:

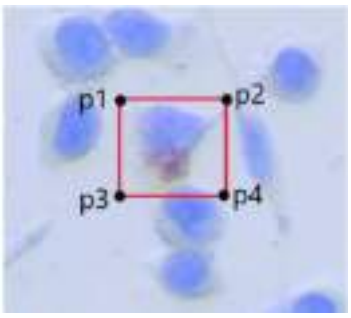


Figura 6.49: Cuatro píxeles de cuadro que delimita las células. Fuente: Elaboración propia.

Estos valores son hallados por medio de la función drawrectangle del software MATLAB 2020, el cual permitió almacenarlos en un archivo Excel. Se ve representado en la siguiente imagen:

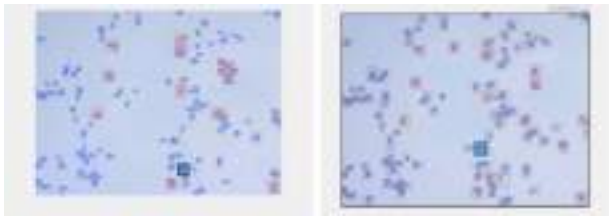


Figura 6.50: Algoritmo de procesamiento de imágenes.Fuente: Elaboración propia

6.2. Cuantificación de células infectadas y no infectadas en imágenes.

Para la cuantificación de células infectadas y no infectadas, se realizó un código en Python que trabaja por medio de procesamiento de imágenes, con la siguiente siguiente metodología:

Como primera parte se emplearon imágenes *groud truth*, es decir de las cuales ya se conocía el valor de células infectadas y no infectadas con el fin de entrenar el algoritmo.

Una vez seleccionada la imagen se convirtió a una escala de grises para realizar un procesamiento a través del filtro Otsu con el cual se elimina ruido y se convierte a una imagen binarizada.

Tras este proceso se realizaron pruebas con diferentes valores de transformaciones morfológicas de erosión y dilatación para obtener el valor con mayor exactitud que abarca el área correspondiente a cada una de las células presentes en la imagen. A la imagen resultante de este proceso se le realizó una marcación a través de conectividad para obtener el número total de células dentro de la imagen (Este valor de células totales cuantificadas por el programa fue comparado y evaluado respecto al valor de células totales cuantificadas por tres (3) expertos del grupo de investigación de Virología, a través del conteo en 6 imágenes diferentes).

Seguido de esto, en el código se obtuvo de cada uno de los píxeles que conforman una célula para ser usado en la obtención de datos para las características de clasificación. El algoritmo de este código se ve representado en la siguiente figura:

Figura 6.51: Algoritmo de preprocesamiento y segmentación de imágenes. Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenidos los píxeles, se hallaron características de color y morfológicas de cada una de las células en la imagen, como se ve representado en la siguiente figura:

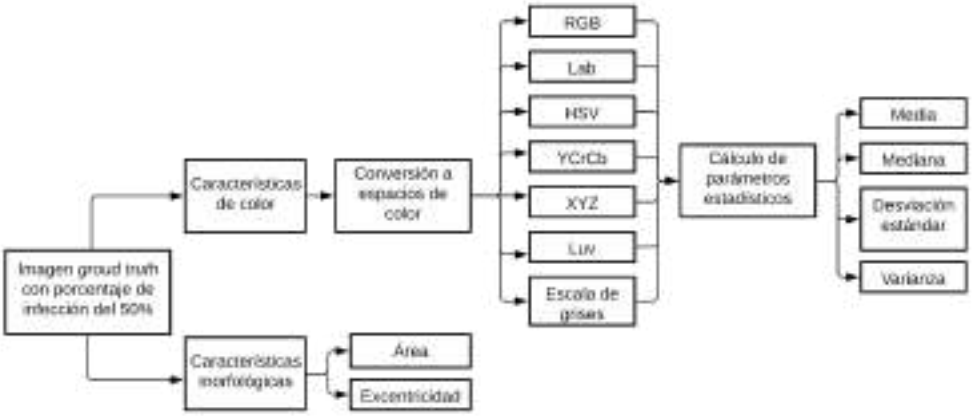


Figura 6.52: Algoritmo extracción de características de imágenes. Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, se realizó una transformación a diferentes espacios de color como lo son RGB, HSV, YCrCb, LAB, XYZ, LUV y escala de grises para la obtención de características de color.

Seguido de esto se calcularon parámetros estadísticos de:

- Media.
- Mediana.
- Varianza.
- Desviación estándar.

Además de estos datos se obtuvieron características morfológicas de área y excentricidad de cada una de las células dentro de la imagen. Con el anterior proceso, se obtuvo una matriz con un total de 78 características, de las cuales 76 fueron de color y 2 morfológicas, se pueden ver representadas en la siguiente tabla:

	Característica color			
Espacio de color	Media	Mediana	Desviación estándar	Varianza
RGB	3	3	3	3
HSV	3	3	3	3
YCrCb	3	3	3	3
LAB	3	3	3	3
GREY	1	1	1	1
XYZ	3	3	3	3
LUV	3	3	3	3
Total	76			

Cuadro 6.1: Características de color obtenidas.

Siguiente a este paso, se desarrolló el proceso de selección de las características discriminantes entre las clases de célula infectada o célula sana, se realizó la matriz de características calculadas para 100 imágenes. Y a partir de estas se construyó una matriz de correlación.

En consiguiente, se emplearon tres métodos diferentes con la finalidad de realizar un filtrado de las características y determinar cuales diferencian de mejor forma las dos clases. Los métodos empleados fueron: Análisis de componentes principales (PCA), Eliminación de características recursivas (RFE) y Búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS) y a partir de su desempeño se eligió el método más apropiado (Figura 6.53) .

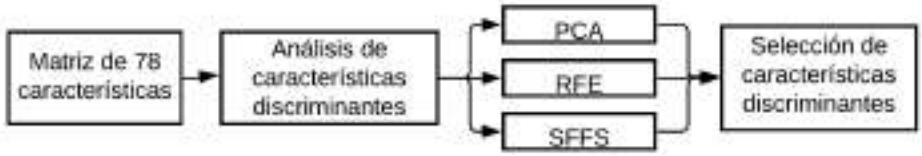


Figura 6.53: Metodología para selección de características discriminantes. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente se ingresaron las características discriminantes elegidas con el método anterior a tres diferentes modelos de clasificación de Random Forest (RF), Máquina de Soporte Vectorial (SVM) y una Red neuronal (NN). Como se visualiza en la siguiente figura:

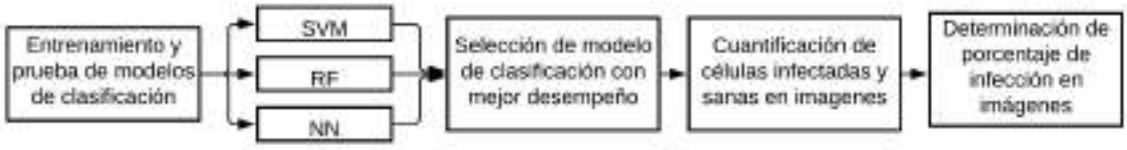


Figura 6.54: Metodología para entrenamiento de modelos de clasificación. Fuente: Elaboración propia.

Tras este proceso, los métodos fueron entrenados a partir de la técnica de validación cruzada y evaluados con matriz de confusión, F1Score, ROC, MSE y rendimiento costo/beneficio para elegir el de mejor desempeño.

Finalmente con ayuda del modelo de clasificación elegido, en el código se realizó la cuantificación

de células no infectadas (M1) e infectadas (M2) con DENV en cada una de las imágenes, para así determinar el porcentaje de infección correspondiente a la imagen través de la siguiente ecuación.

$$\%Is = \frac{M2}{M1 + M2} * 100 \tag{6.1}$$

6.3. Cálculo de título de neutralización 50.

Para obtener el valor de título de neutralización 50, como primer paso se tuvo que implementar un procedimiento con regresión logística, también llamada no lineal de 4 parámetros al software y la conversión de porcentaje de infección celular a títulos anticuerpos neutralizantes contra el virus Dengue, se tuvo en cuenta 4 valores importantes obtenidos por medio del proceso del objetivo anterior:

- Porcentaje de infección correspondiente a cada imagen, representando una dilución diferente (Is).
- Logaritmo del valor de dilución correspondiente a cada imagen.
- Porcentaje de infección de control negativo (I0).
- Porcentaje de infección de control positivo la cual debe ser máximo de 15 %.

Para este procedimiento se siguió el proceso de la cuantificación de títulos de anticuerpos descrita en el artículo escrito por de Alwis y de Silva (2014), ha sido utilizada como referencia en los diferentes laboratorios de investigación, se basa en 6 pasos principales:

El primero tiene como finalidad encontrar el porcentaje infección de acuerdo al valor de de células infectadas (M2), y las células no infectadas (M1), seguido de esto, se establece el porcentaje de infección de utilizando un pocillo de muestra no infectado, es decir un control negativo (I0) y sólo de células, como control positivo (de Alwis & de Silva, 2014).

El porcentaje de células infectadas tiene una relación inversamente proporcional a los valores de títulos de anticuerpos existentes en la muestra (De Alwis & de Silva, 2014), este último no puede ser cuantificado de forma directa por lo que es necesario llegar a este parámetro de forma indirecta cuantificando el porcentaje de células infectadas.

Una vez finalizado el proceso de adquisición de datos, se realizaron las siguientes operaciones:

La primera es para determinar el porcentaje infección de cada muestra, restando cualquier valor porcentual de infección del control negativo (I0), a partir del porcentaje de valores de infección final de todas las muestras experimentales (Is), es decir:

$$Is - 0 = Is - Io \tag{6.2}$$

Seguido de esto se calculó el porcentaje de neutralización (Nx), inducido por los anticuerpos neutralizantes presentes en la muestra del individuo(s), y además el promedio de los valores porcentuales de infección obtenidos de pozos tratados únicamente con células y virus (DVAv), por medio de la ecuación 6.3 (de Alwis & de Silva, 2014).

$$N_x = (100 - (100 \left(\frac{s}{DV_{Av}} \right))) \tag{6.3}$$

Después de hallar estos valores, se relacionaron al valor de Log(1/Dilución), para ser ingresados a un modelo de regresión no lineal de 4 parámetros representado en la ecuación 6.4 con el fin de ser ajustados a una curva sigmoidea de dosis-respuesta (Kleinbaum & Klein, 2010).

$$y = \frac{L}{1 + e^{-k(x-x0)}} + b \tag{6.4}$$

Siguiente a esto se obtiene a del parámetro x0, el cual se refiere al logaritmo inverso de la dilución en la que se obtiene un 50 % de neutralización (Neut50) de la infección por el virus en la muestra (Kraus, Messer, Haymore & de Silva, 2007), también representado como el punto medio en el eje x de la curva dosis-respuesta (de Alwis & de Silva, 2014). Para realizar la conversión directa a títulos de anticuerpos o también llamado dilución de la muestra de suero se realizó la siguiente ecuación:

$$Neut50 = \frac{1}{10^{x0}} \tag{6.5}$$

Por último este valor de NEUT50 evaluado por medio de la regresión logística con la finalidad de establecer si el individuo presenta o no anticuerpos neutralizantes contra virus DENV.

Para realizar la prueba del desempeño del método de regresión logística se utilizaron 30 valores de muestras reales tomadas del laboratorio de Virología. Tras este proceso el método fue evaluado con porcentaje de error, correlación de pearson y coeficiente de asociación lineal.

Finalmente se diseñó la interfaz de usuario en la que se muestra el valor de NEUT50 con la curva dosis-respuesta, además de las 6 imágenes ingresadas a la cuales se les realizó el conteo y un mensaje en el que se declara si el individuo posee o no anticuerpos neutralizantes contra virus DENV.

6.4. Evaluación del método propuesto.

Para la evaluación del desempeño del método se evaluaron los resultados del etiquetado del algoritmo con las imágenes pertenecientes a los grupos de muestras reales.

Como primera parte, se realizó un análisis de matriz de confusión por medio de la cual se evaluó sobre la cantidad de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) que entrega el algoritmo, y a partir de estos valores se obtienen los resultados de especificidad, robustez, sensibilidad y exactitud, F1-Score y Kappa en cuanto a la clasificación de las células en las imágenes.

Siguiente a esto, se evaluó el cálculo del valor de NEUT50 por medio de los índices de: Porcentaje de error, Mean Square Error (MSE), correlación de Pearson y coeficiente de asociación lineal.

6.5. Diseño detallado del prototipo.

Para el diseño detallado del prototipo de adquisición de las imágenes se realizó la metodología que se puede visualizar en la figura 6.55 .

Figura 6.55: Metodología de diseño detallado de prototipo. Fuente: Elaboración propia.

Se tuvo en cuenta que para este caso que las células no estarán fijadas en la placa que ingresará al prototipo, sino que se encontrarán en suspensión en cámara de Neubauer como se propuso en el diseño inicial, ya que es la forma en la que se espera realizar en las prácticas de laboratorio del grupo de investigación.

- Para el diseño del hardware primero se realizó el diagrama funcional del prototipo, seguido de esto la selección de los materiales de construcción, los elementos electrónicos y software a usar a partir de diferentes matrices de decisión con las características necesarias para cumplir con los requerimientos previamente establecidos.
- Una vez obtenido estos materiales se deben desarrollar los diferentes cálculos de medidas para obtener el mejor funcionamiento del dispositivo. Y se realizaron pruebas preliminares de funcionamiento de la cámara microscópica elegida en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

Teniendo en cuenta que la cámara microscópica se debe mover en los ejes X, Y y Z, se investigó y se determinó que las máquinas de control numérico computarizado (CNC) son capaces de mover la herramienta de impresión al mismo tiempo en los tres ejes para ejecutar trayectorias tridimensionales como las que se requieren para el movimiento de la cámara (Warfield, 2020). Por lo cual seguido de esto se realizó una búsqueda de diseños de máquinas CNC, en galerías en línea como Autodesk Online Galery, 3D Content Central, Free3D, Grabcad, Turbosquid, Stechfab, entre otras.

- Con el diseño elegido anteriormente de CNC, se modificó y desarrolló el prototipo esperado, añadiendo la cámara microscópica, y demás componentes de acuerdo a los requerimientos iniciales.
- Siguiente a este diseño se generó la simulación de movimiento y planos mecánicos y técnicos del prototipo.
- Además de esto se realizan los planos eléctricos que se desea implementar con cada uno de los diferentes componentes elegidos anteriormente.
- Finalmente se desarrolló un manual de usuario del prototipo.

Por último el desarrollo total del proyecto se ve representado en el siguiente diagrama:

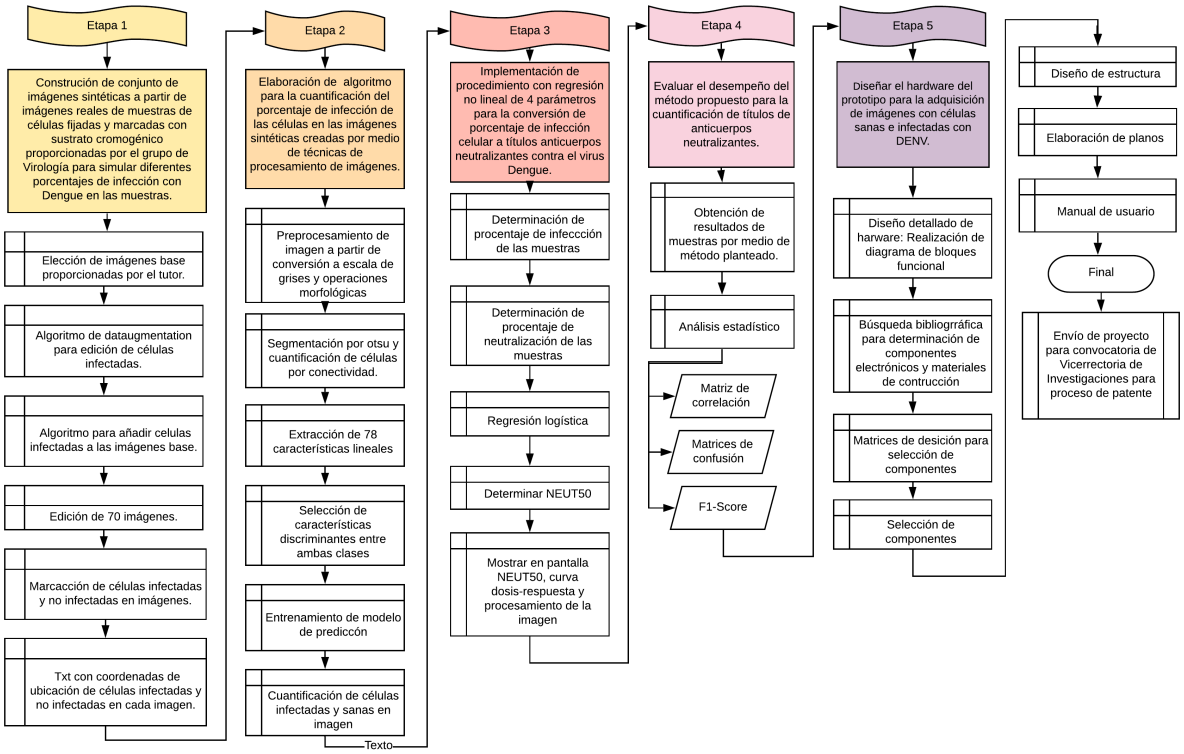


Figura 6.56: Metodología final de proyecto. Fuente: Elaboración propia.

Las entradas y salidas de cada uno de los objetivos se encuentran representados en el siguiente diagrama:

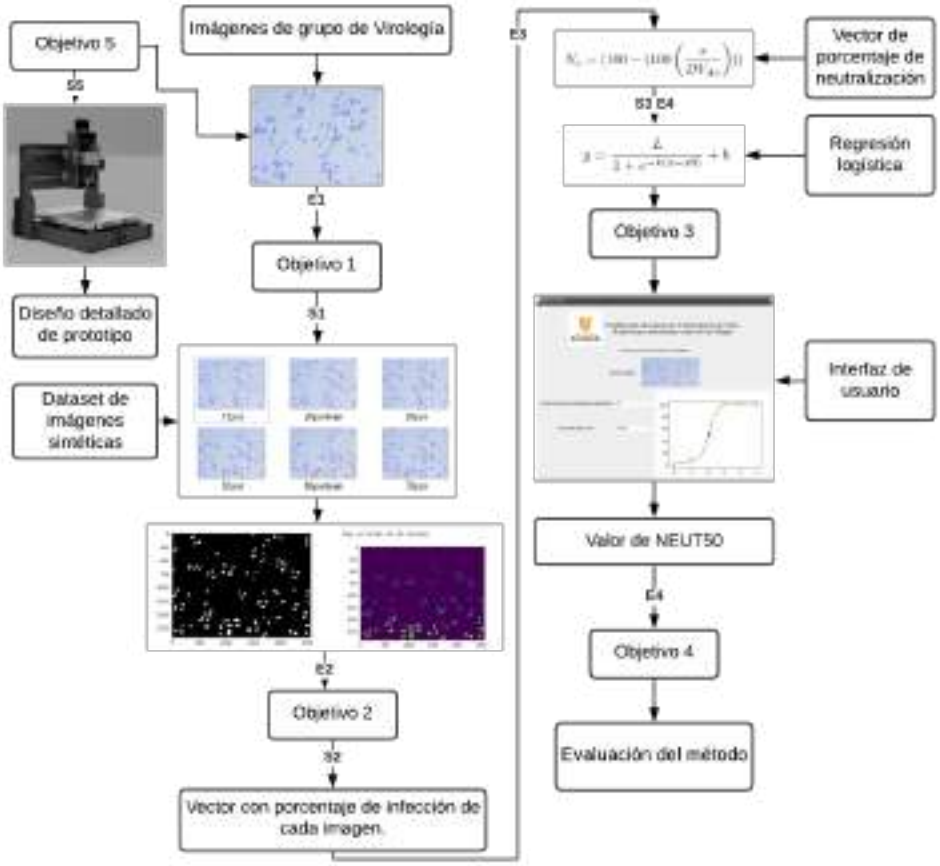
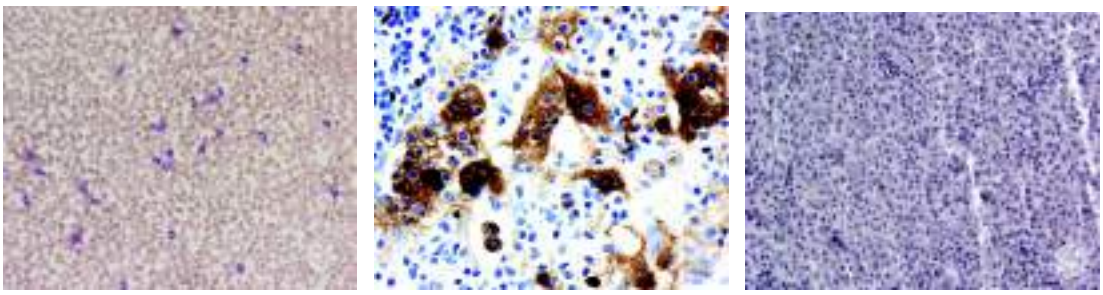


Figura 6.57: Entradas y salidas de objetivos específicos de proyecto. Fuente: Elaboración propia.

7.0.1. Búsqueda de datasets en banco de imágenes

Se realizó la búsqueda de imágenes similares al grupo de imágenes esperado en el objetivo, junto con diferentes palabras claves, de las cuales se encontró:



(a) Indeterminate dendritic cell tumor-Langerin.

(b) Macrofago/Histiocítico y dendrítico Neoplasias y trastornos.

(c) Peripheral blood response to G-CSF -2

Figura 7.58: Dataset encontrado en banco de imágenes. Fuente:https://imagebank.hematology.org/

Sin embargo estas imágenes fueron descartadas debido a que:

- La imagen 7.58a no coincide con los colores del dataset esperado y la marcación de células es diferente a la del método propuesto.
- La imagen 7.58b, no coincide con los colores y además la marcación con sustrato cromogénico presentó manchas en el fondo de las imágenes.
- La imagen 7.58c presenta una alta aglomeración celular por lo tanto no coincide con la densidad celular presentada en el método propuesto.

7.1. Construcción de conjunto de imágenes sintéticas.

Como resultados se obtuvo un conjunto de 15 células modificadas a través del proceso de data aumentation. Transformando su forma, orientación y tamaño (erosión o dilatación) como se ve en las siguientes imágenes.

Figura 7.59: Células transformadas a través de data augmentation

Además de esto se obtuvo un grupo de imágenes sintéticas en las cuales se simulan muestras de un donante a las que se le realiza la cuantificación de título de neutralización 50 contra virus DENV.

Cabe mencionar que son imágenes de tamaño de 2560 px X 1920 px, con resolución de 96 PPP y se encuentran en el espacio de color RGB, además están en formato png o jpg.

Se obtuvo como resultado un grupo de cuarenta y seis (46) imágenes a partir de 3 imágenes base las cuales muestran diferentes patrones de infección y neutralización. Estas imágenes fueron subdivididas en carpetas las cuales simulan una muestra de paciente diferente. En estas, se buscaba tener en cada una de las carpetas un mínimo de 10 imágenes con diferentes porcentajes de infección para incrementar la cantidad de células infectadas en estas y así extraer las características aproximadamente en la misma proporción de cada una de las clases. Por tanto se variaron diferentes porcentajes, no se establecieron como tal un valor determinado de infección, solo la obtención total de 46 imágenes.

A continuación se explicarán los detalles de cada una:

Carpeta	# Imágenes	# Células	Porcentajes de infección
GRUPO 1	10	100	Aumenta de 7 % al 80 %
GRUPO 2	10	110	Aumenta de 15 % al 95 % de 5 en 5
GRUPO 3	10	165	Aumenta de 10 % al 90 % de 10 en 10
GRUPO 4	16	150	Aumenta de 0 % al 75 % de 5 en 5
TOTAL	46	-	-

Cuadro 7.2: Información de grupo 1 agrupo 4 de dataset de imágenes.

En la tabla 7.2, se relaciona el número de imágenes que contiene la carpeta, posteriormente en la columna de # Células , se indica la cantidad de células totales que presenta cada una de las imágenes dentro de esa, es decir la sumatoria entre infectadas y no infectadas y finalmente en la columna que indica los rangos de porcentajes de infección que variaron en las imágenes de cada grupo.

Y se realizó también un dataset de cincuenta y cuatro (54) imágenes más, que se diseñaron a partir de datos reales de infección obtenidos en el laboratorio de Virología, estas presentan un porcentaje de infección del 0 % al 15 % que es el máximo valor de infección aplicado a las células en prácticas de laboratorio reales (de Alwis & de Silva, 2014). Fueron subdivididas en carpetas las cuales simulan una muestra de paciente diferente. A continuación se explicarán los detalles de la muestra y porcentajes de infección dentro de las imágenes para de cada una de ellas:

Carpeta	# Imágenes	# Células	# Imágenes con Ix
R80	4	100	0 % (3), 8 % (1), 11 %(1), 13 %(1)
R106	4	100	0 % (1), 8 % (1), 12 %(3), 13 %(1)
R152	3	100	0 % (2), 8 % (1), 11 %(2), 13 %(1)
R176	5	100	0 % (2), 8 % (1), 11 %(1), 1 %(1)
R206	4	100	0 % (2), 2(1), 11 % (1), 14 %(2)
R213	5	100	0 % (1), 4 % (1), 11 %(1), 13 %(2), 15 %(1)
R221	5	100	0 % (2), 10 % (1), 12 %(2), 13 %(1)
R93	5	100	0 % (1), 4 % (1), 10 %(1), 12 %(1), 13 %(1), 16 %(1)
R209	4	100	0 % (1), 2 % (1), 11 %(1), 14 %(1)
R215	3	100	0 % (1), 10 %(1), 12 %(1)
R128	4	100	0 % (1), 8 % (1), 12 %(1), 13 %(1)
R253	4	100	0 % (1), 6 % (1), 13 %(1), 14 %(1)
R48	4	100	0 % (1), 2 % (1), 10 %(1),13 %(1)
TOTAL	54	-	-

Cuadro 7.3: Información de 13 muestras de dataset de imágenes.

En la tabla 7.3, se relaciona el número de imágenes que contiene la carpeta correspondiente a cada individuo, posteriormente en la columna de # Células, se indica la cantidad de células totales que presenta cada una de las imágenes dentro de esa, es decir la sumatoria entre infectadas y no infectadas y finalmente en la columna que indica # Imágenes con Ix , se indica el número de repeticiones que presenta la muestra para cada valor de infección, es decir, el individuo R80, presenta un valor del 0 % de infección en las primeras tres diluciones representadas a partir de las imágenes, en la dilución número 4 presenta una infección celular del 8 % , en la dilución 5 presentó un 11 % de infección y finalmente en la dilución 6 presentó un 13 % de infección.

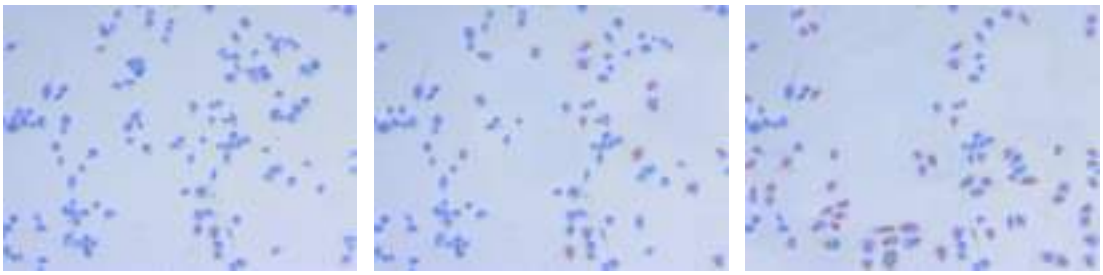
Todo esto con la finalidad de documentar y explicar la composición de los diferentes grupos de imágenes que conforman el dataset sintético.

De acuerdo a lo anterior se obtuvo un total de **100** imágenes en el dataset (Anexo A).

Las imágenes del grupo 1 a 4, fueron desarrolladas como imágenes *ground truth* con la finalidad de presentar aproximadamente la misma cantidad de células infectadas y no infectadas para la extracción de características de estas y los entrenamientos de los modelos en la etapa dos.

Debido a que en los siguientes grupos del dataset se recrearon a partir de muestras reales del laboratorio de virología, el porcentaje de infección máximo en estas era del 15 % por tanto, la cantidad de células infectadas en las imágenes era muy baja en relación a las no infectadas. Y no se extraería la misma cantidad de información de características de cada una de las clases.

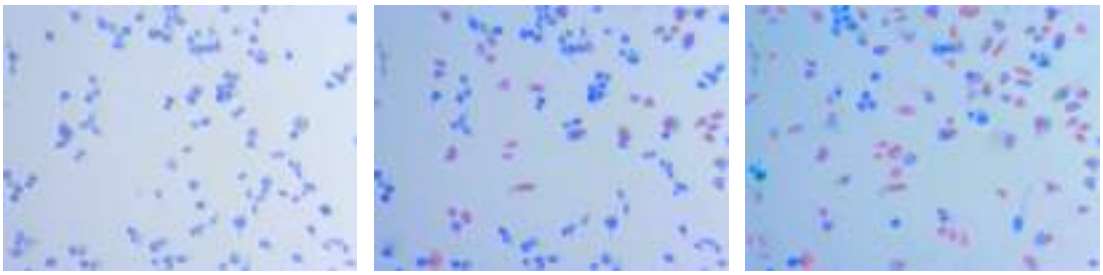
La figura 7.60a , corresponde a imágenes del Grupo 1, en las cuales se muestra un porcentaje de neutralización total en el cual solo se obtiene una célula infectada, la figura 7.60b muestra un porcentaje de neutralización diferente en el cual se ve parcialmente disminuida la neutralización del virus en las células y la figura 7.60c muestra un porcentaje de neutralización inferior a los ensayos anteriores mostrando un mayor número de células infectadas por el virus.



(a) Imagen base. (b) Porcentaje de infección de 15 %. (c) Porcentaje de infección de 60 %.

Figura 7.60: Grupo 1 de dataset. Fuente: Elaboración propia.

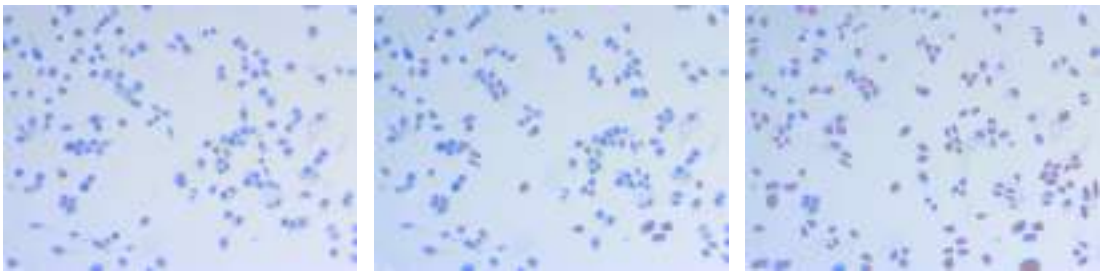
La figura 7.61, corresponde a imágenes del Grupo 2:



(a) Imagen base. (b) Porcentaje de infección de 35 %. (c) Porcentaje de infección de 75 %.

Figura 7.61: Grupo 2 de dataset. Fuente: Elaboración propia.

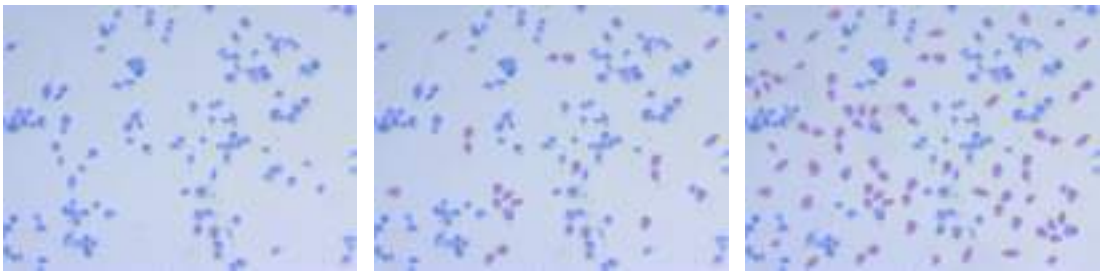
La figura 7.62, corresponde a imágenes del Grupo 3:



(a) Imagen base. (b) Porcentaje de infección de 30 %. (c) Porcentaje de infección de 90 %.

Figura 7.62: Grupo 3 de dataset. Fuente: Elaboración propia.

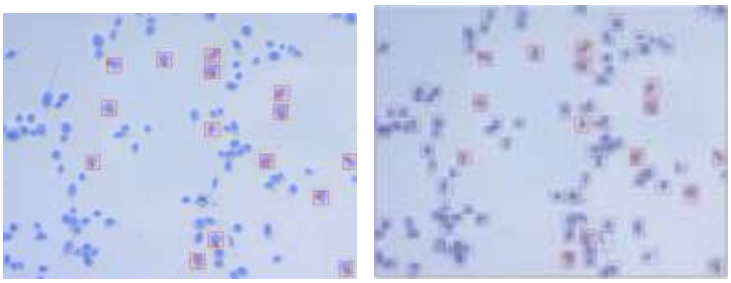
La figura 7.63, corresponde a imágenes del Grupo 4:



(a) Imagen base. (b) Porcentaje de infección de 15 %. (c) Porcentaje de infección de 60 %.

Figura 7.63: Grupo 4 de dataset. Fuente: Elaboración propia.

Siguiente a esto, de cada imagen realizada se obtuvo una copia de la imagen con solo las células infectadas señalizadas (Fig.7.64a) y otra copia de la imagen con todas las células señalizadas (De color morado para las no infectadas y de color rojo para las infectadas) (Fig.7.64b).



(a) Células infectadas señaladas. (b) Células infectadas y no infectadas señaladas.

Figura 7.64: Procesamiento de imagen para cuantificación de células. Fuente: Elaboración propia.

Por último para cada imagen se generó la siguiente tabla, de acuerdo a las coordenadas x y y de cada uno de los cuatro puntos del cuadro de señalización de cada célula en la imagen. Como se visualiza en la siguiente imagen:

60%Dato	p1		p2		p3		p4		Clase
No.Celula.	x	y	x	y	x	y	x	y	
1	737	385	837	303	737	405	837	405	1
2	1121	289	1221	289	1121	389	1221	389	0
3	1477	257	1577	257	1477	357	1577	357	0
4	1457	365	1557	365	1457	465	1557	465	0
5	1965	525	2065	525	1965	625	2065	625	0
6	1953	653	2053	653	1953	753	2053	753	0
7	1861	1017	1961	1017	1861	1117	1961	1117	1
8	2241	1273	2341	1273	2241	1373	2341	1373	0
9	2257	1269	2357	1269	2257	1369	2357	1369	0
10	2433	1793	2533	1793	2433	1893	2533	1893	0
11	1557	1737	1457	1737	1357	1837	1457	1837	0
12	585	1025	685	1025	585	1125	685	1125	1
13	697	637	797	637	697	737	797	737	0
14	1465	789	1565	789	1465	889	1565	889	0
15	1481	1593	1581	1593	1481	1693	1581	1693	0

Figura 7.65: Tabla con coordenadas de 4 puntos de células en cada imagen. Fuente: Elaboración propia.

Y se le añadió una columna en la cual se indica la clase de la célula, 0 en caso de que sea no infectada y 1 en caso de que sea infectada. Esta tabla fue realizada con la finalidad de entrenar los modelos de clasificación en la etapa 2 del proyecto.

7.2. Cuantificación de células infectadas y no infectadas con DENV en imágenes.

7.2.1. Pre-procesamiento y segmentación de la imagen

Tras el proceso de conversión a escala de grises, realizo un análisis detallado de las transformaciones morfológicas que se aplicarían a las imágenes, con la finalidad de evitar aglomeración celular. Por tanto, se realizaron diferentes pruebas en las cuales se modificaba el valor de iteraciones que se aplico a la imagen. Con lo que se determinó que este valor afecta directamente la cantidad de células cuantificadas en la imagen posterior a realizar la segmentación por conectividad.
Al momento que se aplicó la transformación morfológica de dilatación con 15 iteraciones se obtuvo el siguiente resultado:

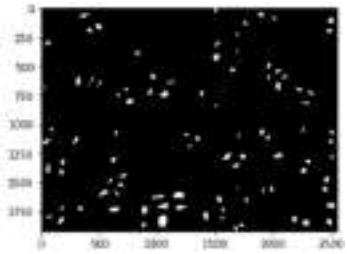


Figura 7.66: Imagen con dilatación de 15 iteraciones. Fuente: Elaboración propia.

Como se puede visualizar el área de las células disminuye a medida que se aumentan las iteraciones. Lo que incide en la cuantificación de células en la imagen. Este valor de células respecto a la cantidad de iteraciones se ve representado en la siguiente tabla:

Iteraciones	Cantidad de células cuantificadas
3	97
5	95
7	95
10	95
15	94

Cuadro 7.4: Variación en iteraciones de dilatación en la imagen vs incidencia en conteo de células.

Al momento que se aplicó la transformación morfológica de erosión con 15 iteraciones se obtuvo el siguiente resultado:

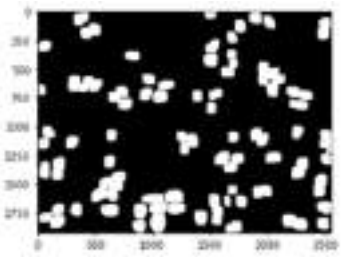


Figura 7.67: Imagen con erosión de 15 iteraciones. Fuente: Elaboración propia.

Como se puede visualizar el área de las células aumenta a medida que se aumentan las iteraciones. Lo que incide en la cuantificación de células en la imagen. Este valor de células respecto a la cantidad de iteraciones se ve representado en la siguiente tabla :

Iteraciones	Cantidad de células cuantificadas
3	97
5	97
7	97
10	97
15	97

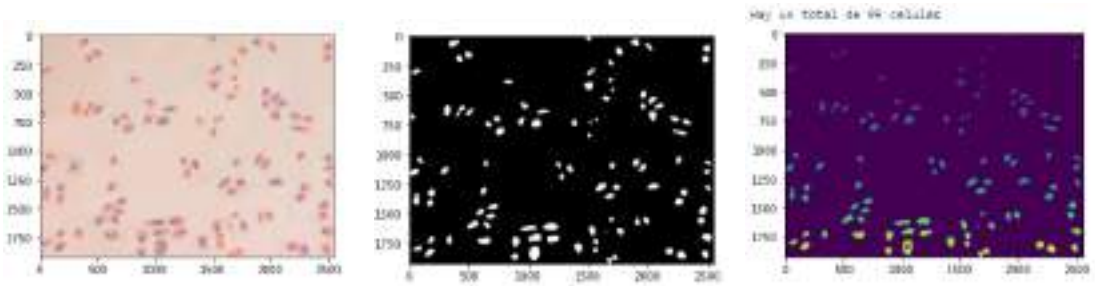
Cuadro 7.5: Variación en iteraciones de erosión en la imagen vs incidencia en conteo de células.

Sin embargo no se logró una cuantificación exacta por tanto se continuó con pruebas de transformaciones morfológicas conjuntas. Al momento que se aplicaron las transformaciones morfológicas de erosión y dilatación al mismo tiempo se obtuvo los siguientes resultados:

Iteraciones de erosión	Iteraciones de dilatación	Cantidad de células cuantificadas
5	3	95
7	3	96
12	4	99
15	4	98
17	7	97

Cuadro 7.6: Variación en iteraciones de dilatación y erosión en la imagen vs incidencia en conteo de células.

De acuerdo a lo anterior, tras las técnicas de procesamiento de imágenes empleadas, se obtuvo los siguientes resultados (Fig.7.68):



(a) Imagen seleccionada.

(b) Umbralización por Otsu y transformaciones morfológicas.

(c) Segmentación: Marcación y cuantificación de células por conectividad

Figura 7.68: Procesamiento de imagen para cuantificación de células. Fuente: Elaboración propia.

Por tanto, el valor de iteraciones que presenta mayor exactitud para la cuantificación de células en la imagen fue de 12 iteraciones de erosión y 4 de dilatación, llegando a un valor de cuantificación de 99 de 100 células. También se pudo deducir que el método de Otsu junto con el de marcación de células por conectividad fue adecuado para realizar la segmentación y cuantificación de las células en la imagen.

Sin embargo, cabe resaltar que se logra una mayor exactitud al cuantificar células en las imágenes cuando estas presentan un porcentaje de infección alto, de lo que se infiere que es debido a que se reduce la aglomeración celular de las células reales en las imágenes al añadir células infectadas sintéticas a esta.

El algoritmo del código realizado en Python se ve representado en la figura 7.69.

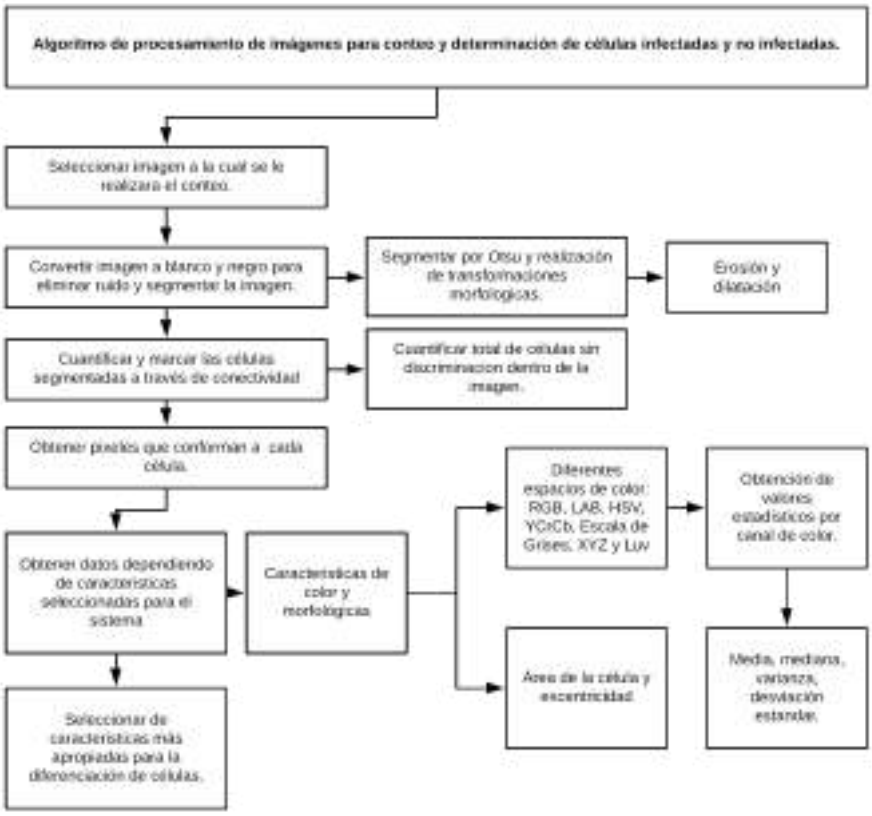


Figura 7.69: Algoritmo del código realizado en Python para procesamiento de imágenes.

Siguiente a este paso, como se visualiza en la figura 7.70 se realizó conversión de la imagen a 6 espacios de color, a partir de las cuales se obtuvo las 78 características correspondientes a cada célula en la imagen y se construyó la matriz de características. Esta cantidad con la finalidad de buscar qué tipo de característica diferenciaba de mejor forma las células infectadas y no infectadas con DENV.

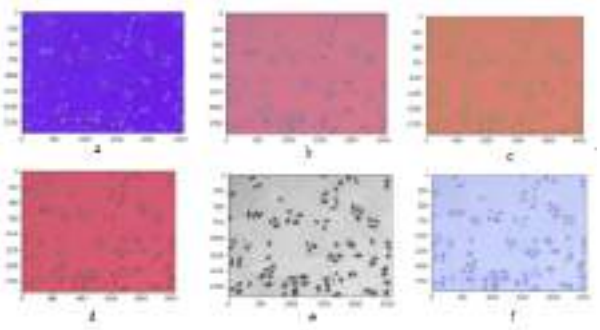


Figura 7.70: Conversión de imagen a espacios de color. a. HSV. b. YCrCb. c. LAB. d. LUV. e. GREY. f. XYZ. Fuente: Elaboración propia.

Figura 7.71: Diferencia entre células infectadas y no infectadas en los diferentes espacios de color. Fuente: Elaboración propia.

Se eligieron los índices estadísticos mencionados en la metodología debido a que, la media de la imagen en diferentes espacios de color puede variar a momento que el color no sea uniforme en todo el área, es decir, en las células infectadas este cambia ya que presenta dos colores (Azul y morado), en cambio las células no infectadas presentaron solo uno (Azul). Por otra parte, el valor de mediana, a diferencia de la media, influye en los valores centrales de la distribución de los píxeles pero es insensible a los valores extremos, además de esto la varianza y la desviación estándar permite medir el grado de dispersión entre los valores de los pixeles en la imagen por tanto, puede identificar el cambio de color en los bordes de las células causando una mayor dispersión en los datos respecto a su media.

Por último, la excentricidad se eligió ya que este valor en las células podía variar al presentar la marcación con el sustrato cromogénico, modificaba su morfología y además su área al aumentar tamaño del borde de la célula.

7.2.2. Selección de características

Para entrenar el proceso que se describe a continuación se emplearon muestras de células de 100 imágenes del dataset de entrenamiento, es decir un 70 % de este y de prueba se emplearon 30 imágenes, siguiendo el método de validación cruzada.

7.2.2.1. Análisis de linealidad de las características

Una vez se obtuvo las 78 características principales, se analizó la correlación lineal entre estas a partir del coeficiente de Pearson (Pértegas & Pitas, 2002; Frumence et al.,, 2019). Puede calcularse dividiendo la covarianza de ambas entre el producto de las desviaciones típicas de las dos variables, como se visualiza en la siguiente fórmula (Pértegas & Pitas, 2002; Mukaka, 2012):

$$\rho XY = \frac{\sigma XY}{\sigma X \sigma Y} \tag{7.1}$$

Entonces, cada una de las características se comparan con las demás a partir de este coeficiente, resultando la matriz de linealidad presente en la siguiente figura:

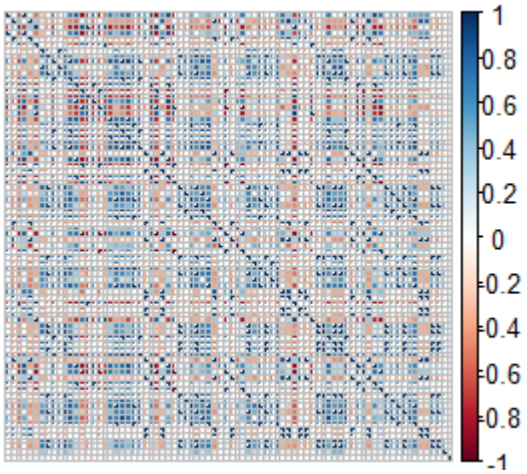


Figura 7.72: Matriz de coeficiente de Pearson para las 78 características calculadas. Fuente: Elaboración propia.

La magnitud de la relación puede estar entre ±1. Cuanto más fuerte es la correlación, más se acerca el coeficiente de correlación a ±1. Por lo que:

- Si el coeficiente es un número positivo, las variables están directamente relacionadas (Mukaka, 2012).
- Si el coeficiente es un número negativo, las variables están inversamente relacionadas (Mukaka, 2012).

De acuerdo a lo anterior, se puede visualizar en la figura (7.72), que existen varias características correlacionadas ya sea de forma positiva o e forma negativa. En este caso se representa el valor de correlación dependiendo del color que se resalte la celda en la matriz y en el lado derecho de la gráfica se indica a qué valor corresponde, siendo así el color azul oscuro una correlación de 1 positiva, el color blanco un correlación de 0 y el color rojo una correlación de 1 negativa.

Sin embargo este método no es altamente preciso por tanto se debe recurrir a métodos de selección de características más específicos.

7.2.2.2. Técnicas de selección de características

Se emplearon tres técnicas de selección de características, PCA, RFE y SFFS (Leyva, 2007; Violini, 2014; Shirbani & Soltanian, 2013). Sin embargo al probarlos se descartó la técnica RFE, debido a que al entrenar el método eligió las 65 características, como se puede visualizar en la figura 7.73 donde se relaciona cantidad de características elegidas vs exactitud. Y muestra que el valor máximo de exactitud fue de 0, 96 al elegir 65 variables.

Por tanto, en este caso se requiere de técnicas que presenten un mejor comportamiento para problemas de tipo no lineal o que realicen la discriminación por medio de un método matemático diferente para obtener la menor cantidad de características discriminantes con el mejor desempeño para reducir el costo computacional del código.

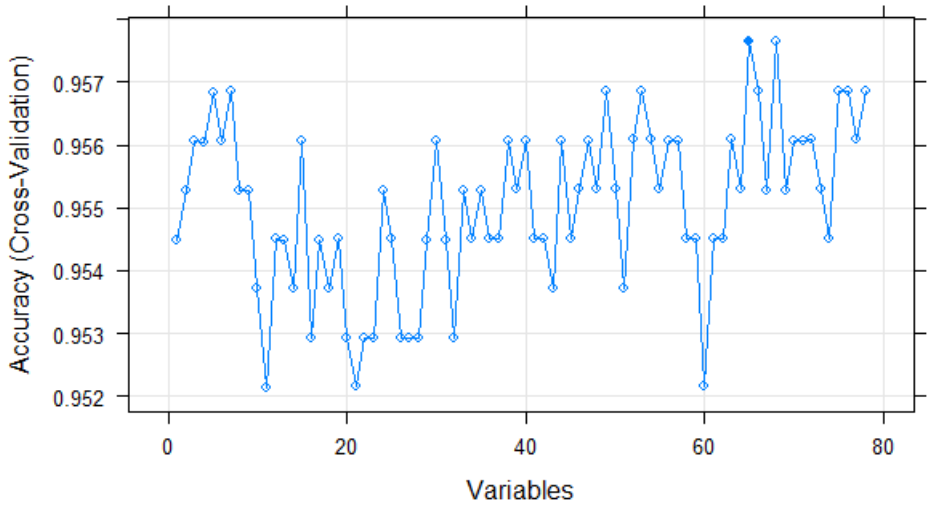


Figura 7.73: Selección de cantidad de características adecuado según método RFE. Fuente: Elaboración propia.

A partir de esto la técnica SFFS y PCA pasaron el filtro. En consiguiente, se utilizaron ambas técnicas para los modelos de clasificación.

La técnica SFFS demostró los siguientes resultados:

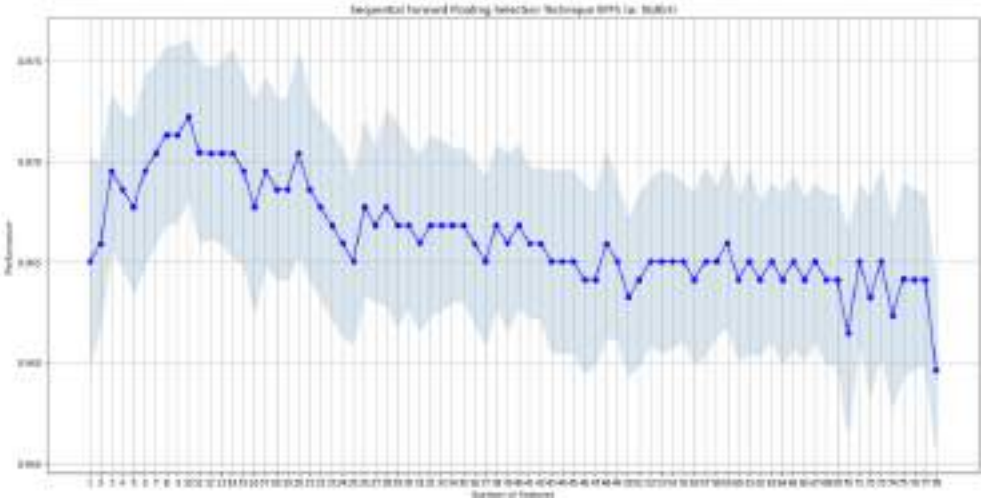


Figura 7.74: Selección de cantidad de características adecuado según método SFFS. Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se relaciona la cantidad de características elegidas vs desempeño. Y muestra que el valor máximo de exactitud fue de 0, 972 al elegir 10 características, las cuales fueron :

- Desviación estándar en el canal G de RGB.

- Mediana en el canal Y de YCrCb.
- Media en el canal L de LAB.
- Media en el canal A de LAB.
- Mediana en el canal L de LAB.
- Desviación estándar en el canal B de LAB.
- Desviación estándar en el canal L de LUV.
- Desviación estándar en el canal U de LUV.
- Media en el espacio GRAY.
- Excentricidad.

El valor de 0,972 que fue el valor más alto obtenido a partir de tres entrenamientos. En el primer entrenamiento la técnica eligió 7 características, sin embargo este obtuvo un valor de 0,923 y en el segundo se eligieron 8 sin embargo este presentó un accuracy de 0,95. Por tanto se eligieron las 10 características debido a que demostró el mejor desempeño.

En cuanto a la técnica de PCA, para interpretar cada componente principal, se observan los vectores ortogonales según la magnitud y la dirección de los coeficientes de las variables originales, como se visualiza en la figura 7.75), con una gráfica de dispersión en la que se relaciona los valores de dos componentes PCA (PC1 y PC2) y a partir de esto, entre mayor sea el valor absoluto del coeficiente calculado, la variable correspondiente tendrá mayor importancia en el cálculo del componente (Leiva, 2007).

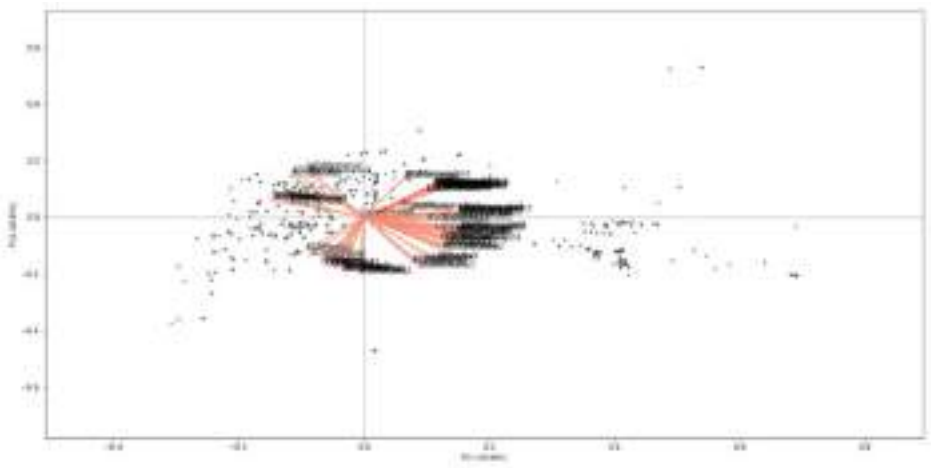


Figura 7.75: Gráfica PCA. Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica 7.76, se observa la varianza acumulada según el número de componentes, a partir del cual se elige la cantidad óptima de estos teniendo en cuenta que el valor que sea más cercano a 1, siendo el límite inferior 0.95 (Serna, 2017), por tanto se eligen los componentes del 1 al 10 debido a que en este valor la varianza acumulada es de 1, además que desde el componente 10 en adelante el valor de varianza es constante por tanto no varía en relación a la acumulada hasta el componente PC10.

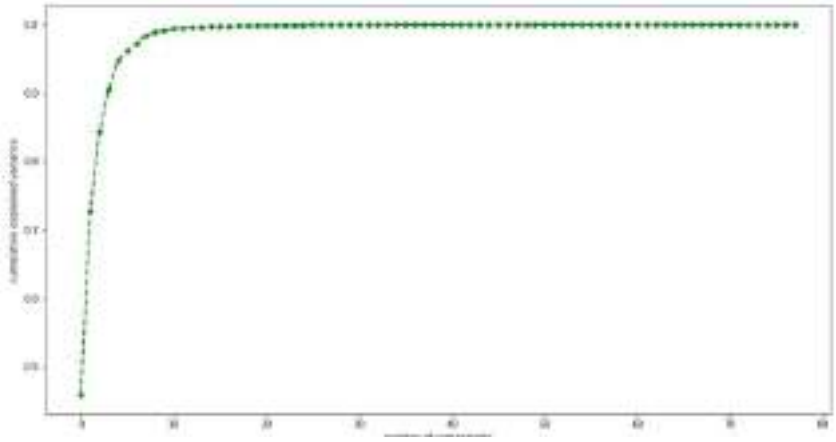


Figura 7.76: Gráfica varianza acumulada de componentes en PCA.Fuente: Elaboración propia.

7.2.3. Selección de modelos de clasificación

Para el proceso de clasificación binaria de las características, los modelos de clasificación fueron seleccionados mediante literatura (Chy & Rahaman, 2019; Gupta & Bhavsar, 2017; Kavitha et al., 2017; Mishra et al., 2017; Tomiyama et al., 2018), fueron los siguientes: Red Neuronal Artificial (NN), Máquina de soporte vectorial (SVM) y Bosques aleatorios (RF). Dependiendo de la naturaleza de las características, los parámetros de cada clasificador fueron los siguientes: la red neuronal tipo perceptrón multicapa que constaba de 10 neuronas en la primera capa, con una función de activación tipo logística; para la máquina de soporte vectorial, se utilizó un kernel gauss tipo rbf y para el clasificador de bosques aleatorios se utilizó un número de 100 estimadores.

Cabe resaltar que los parámetros de los clasificadores fueron tomados tanto de la literatura, como de aquellos que representaron mejor rendimiento.

En este paso se entrenaron los modelos de clasificación con las dos técnicas de selección de características. Por tanto se obtuvo 6 diferentes modelos:

- PCA-SVM.
- PCA-RF.
- PCA-NN.
- SFFS-SVM.
- SFFS-RF.
- SFFS-NN.

Posterior al entrenamiento y prueba con las 100 imágenes se determinaron los índices de evaluación de Accuracy, F1 Score, ROC y MSE, con la finalidad de elegir el clasificador de mejor desempeño. Estos índices se consignaron en la siguiente tabla:

	Accuracy	F1-Score	ROC - AUC	MSE
PCA-SVM	0,97	0,9	0,9541	0,0251
SFFS-SVM	0,97	0,9	0,9467	0,0272
PCA-RF	0,97	0,9	0,9317	0,0313
SFFR-RF	0,96	0,87	0,9119	0,0439
PCA-NN	0,97	0,9	0,9517	0,0292
SFFR-NN	0,96	0,87	0,9293	0,0356

Cuadro 7.7: Índices de evaluación de modelos de clasificación.

Teniendo en cuenta estos resultados los clasificadores de mejor desempeño fueron tres: PCA-SVM, SFFS-SVM y PCA-NN. Ya que presentaron los valores que más se acercaron a 1 en Accuracy, F1-Score, ROC (Figura 7.77) y además presentaron los menores valores de MSE (Figura 7.77).

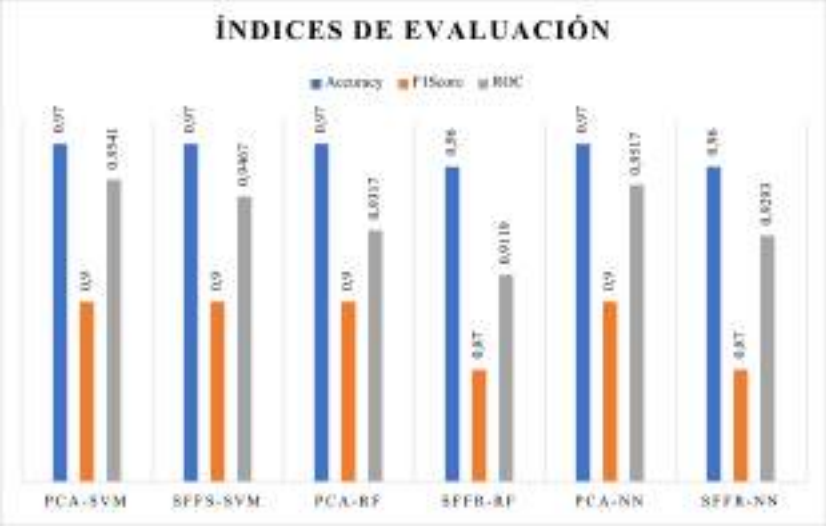


Figura 7.77: Comparación de rendimiento de modelos. Fuente: Elaboración propia.

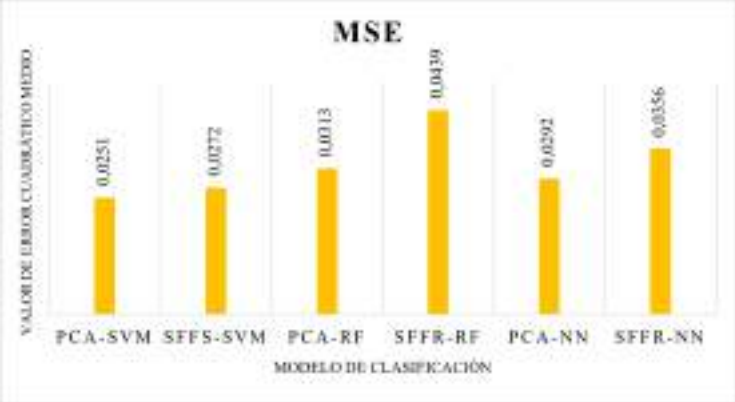


Figura 7.78: Comparación de MSE en modelos. Fuente: Elaboración propia.

Siguiente a este proceso se realizó el proceso de elección del mejor clasificador a partir de los índices de evaluación y la relación costo/beneficio que se obtuvieran al entrenar los métodos con muestras de células correspondientes.

Se tomó el parámetro de rendimiento costo/beneficio de los modelos como índice de evaluación. Se espera reducir el tiempo operacional del código. Este proceso presentó un tiempo de ejecución de 2114 segundos, es decir 35 minutos aproximadamente por cada imagen.

Para el desarrollo experimental de estas pruebas se empleó un computador de procesador INTEL® CORE ^{TM}I5, una memoria RAM de 12GB y los módulos de Python de Pandas, Numpy, Scikit-learn, Math, Time y Statistics.

En este proceso, lo que se realizó fue la comparación de tiempo de ejecución de cada clasificador. Desde el momento de que ingresa la matriz de características de la imagen al modelo, hasta que se indica el porcentaje de infección.

De lo cual se obtuvo los siguientes resultados:

	Accuracy	Tiempo de ejecución (s)	Accuracy/Tiempo
SFFS-SVM	0,97	0,017431867	55,64521544
PCA-SVM	0,97	0,482328416	2,011077861
PCA-NN	0,97	1,165863142	0,832001601

Cuadro 7.8: Índices de rendimiento costo/beneficio de modelos

Por tanto se eligió el modelo SFFS-SVM debido a que demostró el mejor desempeño en la prueba de evaluación costo/beneficio (Figura 7.79).

Figura 7.79: Comparación de rendimiento costo/beneficio de modelos. Fuente: Elaboración propia.

7.3. Cálculo de título de neutralización 50.

El algoritmo del código realizado en Python se ve representado en la figura 7.80.

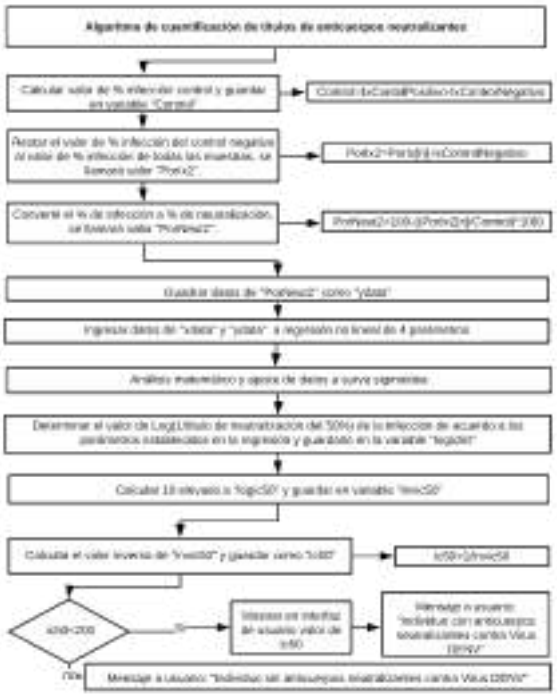


Figura 7.80: Algoritmo del código realizado en Python debe realizó el siguiente procedimiento para hallar el NEUT50. Fuente: Elaboración propia.

El método fue entrenado con 30 datos provenientes de muestras reales de donantes de sangre del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque. Cada uno de estos datos presentan la siguiente información:

- Porcentaje de infección según la dilución del suero (Ix).
- Porcentaje de neutralización según el logaritmo inverso de la dilución del suero (Nx).
- El logaritmo inverso de la dilución del suero en la que se neutraliza el 50 % de la infección por el virus (LOG NEUT50 (1/DILUTION)). Cabe resaltar que este valor es el de x0 hallado con la regresión no lineal de 4 parámetros.
- El valor inverso de la dilución del suero en la que se neutraliza el 50 % de la infección por el virus (NEUT50 (1/DILUTION)).
- El valor de la dilución del suero en la que se neutraliza el 50 % de la infección por el virus (NEUT50).

Se ven resumidos en la siguiente tabla:

	R90
DILUTION	Ix
10	-0,11
100	-0,13
1000	-0,11
10000	7,75
100000	11,31
1000000	12,67
LOG (1/DILUTION)	Nx
-1	100,88
-2	101,05
-3	100,86
-4	38,28
-5	9,95
-6	-0,89
LOG NEUT50 (1/DILUTION)	-3,8561
NEUT50 (1/DILUTION)	0,00014
NEUT50 (DILUTION)	**6974**

Cuadro 7.9: Información sobre prueba de donante para hallar NEUT50. Fuente: Grupo de Virología.

A partir de esta información, el método de regresión no lineal de 4 parámetros propuesto toma los valores de Nx como vector y y el LOG (1/DILUTION) como vector x, gráfica la curva sigmoidea y obtiene los 4 parámetros de L, x0, k y b. Como se visualiza en la siguiente imagen:

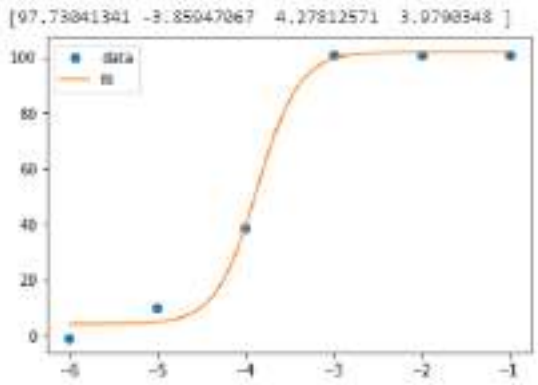


Figura 7.81: Curva sigmoidea hallada a partir de método planteado. Fuente: Elaboración propia.

Como primera parte se comparó el valor de x0 obtenido (Fig.7.81) con respecto a el valor de x0 obtenido a partir del software GraphPad Prism que es el empleado en las pruebas del laboratorio para hallar el valor de NEUT50, con la finalidad de verificar que los cálculos que realizara el método propuesto fueran correctos y el nivel de exactitud que este presentara, en la figura 7.82 se representa de forma gráfica la comparación entre ambos valores, teniendo como eje x la muestra y eje y el valor de X0 obtenido, se puede inferir de esta, que solo 5 valores de los 30 calculados presentaron una diferencia significativa con respecto al método de referencia.

Figura 7.82: Comparación de cálculo de X0 real con método propuesto. Fuente: Elaboración propia.

Los valores se ven representados en la siguiente tabla con su respectivo porcentaje de error:

Muestra	Valor de X0 (GraphPad)	Valor de X0 (Método propuesto)	Porcentaje de error
1	-3,843	-3,856	0,33
2	-3,790	-3,691	2,61
3	-1,956	-2,077	6,19
4	-1,961	-1,961	0,03
5	-2,952	-2,811	4,78
6	-2,941	-3,005	2,19
7	-2,623	-2,393	8,76
8	-2,530	-2,576	1,79
9	-3,487	-3,588	2,89
10	-3,568	-3,544	0,66
11	-2,252	-2,202	2,24
12	-2,264	-2,236	1,28
13	-2,714	-2,621	3,41
14	-2,656	-2,683	1,04
16	-1,650	-1,787	8,29
17	-2,522	-2,698	6,98
18	-2,684	-2,670	0,52
19	-2,196	-2,265	3,15
20	-2,219	-2,164	2,48
21	-1,921	-1,456	24,22
22	-0,907	-1,316	45,10
23	-2,779	-2,773	0,20
24	-2,778	-2,781	0,10
25	-1,930	-1,864	3,41
26	-1,806	-1,856	2,76
27	-1,897	-0,514	72,91
28	0,248	-0,832	435,26
29	-2,568	-2,629	2,39
30	-2,656	-2,682	0,98

Cuadro 7.10: Comparación de cálculo de X0 real con método propuesto.

Como se puede ver en la anterior tabla, aproximadamente un 80 % de los datos calculados presentan un porcentaje de error menor al 20 % permitido (Fallarero, Hanski & Vuorela, 2014).

Se pudo deducir que los datos que presentaron un porcentaje de error mayor fueron aquellos en los que en el vector de porcentaje de neutralización de los datos de entrenamiento presentaban un *outlier* causado por errores en diagnóstico del laboratorio. Por tal caso este valor afectó la regresión disminuyendo la exactitud del método.

Siguiente a esto se halló el valor de NEUT50, con el cual se clasificó según la presencia o no de anticuerpos contra virus DENV, y se comparó respecto al valor de NEUT50 obtenido en el laboratorio. Como se muestra en la siguiente tabla:

Muestra	NEUT50 Real	Clase Real	NEUT50 Calculado	Clase Calculada
1	6974	1	7143	1
2	6161	1	5000	1
3	90	0	119	0
4	91	0	91	0
5	896	1	649	1
6	873	1	1010	1
7	420	1	248	1
8	339	1	376	1
9	3071	1	3846	1
10	3694	1	3448	1
11	179	0	159	0
12	184	0	172	0
13	517	1	418	1
14	452	1	483	1
15	23	0	85	0
16	45	0	61	0
17	332	1	500	1
18	483	1	467	1
19	157	0	184	0
20	166	0	146	0
21	83	0	1	0
22	8	0	21	0
23	601	1	595	1
24	600	1	602	1
25	85	0	73	0
26	64	0	72	0
27	79	0	3	0
28	0	0	7	0
29	370	1	426	1
30	452	1	481	1

Cuadro 7.11: Comparación de cálculo de NEUT50 real con método propuesto.

De acuerdo a la tabla 7.11, el método propuesto clasifica la presencia o no de anticuerpos neutralizantes contra virus Dengue, de la misma forma como lo realiza el método de referencia, como se puede ver en las columnas de clases presentan resultados iguales en ambos.

Por otra parte, en las columnas de NEUT50 se indica el valor calculado a partir del valor de X0

convertido a títulos de anticuerpos, y con estos valores se calcularon dos índices de evaluación como lo son coeficiente de determinación y coeficiente de correlación entre ambos.

El coeficiente de determinación o también llamado r cuadrado es utilizado para determinar la varianza total que una variable que se genera en una regresión. Este coeficiente comúnmente llamado R cuadrado, y está dado por la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{\sigma_{xy}^2}{\sigma_x^2 * \sigma_y^2} \tag{7.2}$$

Siendo σ_{xy} el valor de varianza de los datos (X,Y),σ_x^2 la varianza para los datos de X y σ_y^2 la varianza para los datos en Y (Achelis,2004).

Teniendo esto en cuenta, se realizó el cálculo de este coeficiente para el cual arrojó un valor de 0,97 entre el valor obtenido por el método gold standard y el método propuesto. (Fig.7.83). Con lo que se comprobó que el método propuesto generó resultados linealmente relacionados a los valores del método real y que el método propuesto clasifica la presencia de anticuerpos en las muestras, siendo 1 presencia de anticuerpos y 0 lo contrario de la misma forma que lo hace el método de referencia.

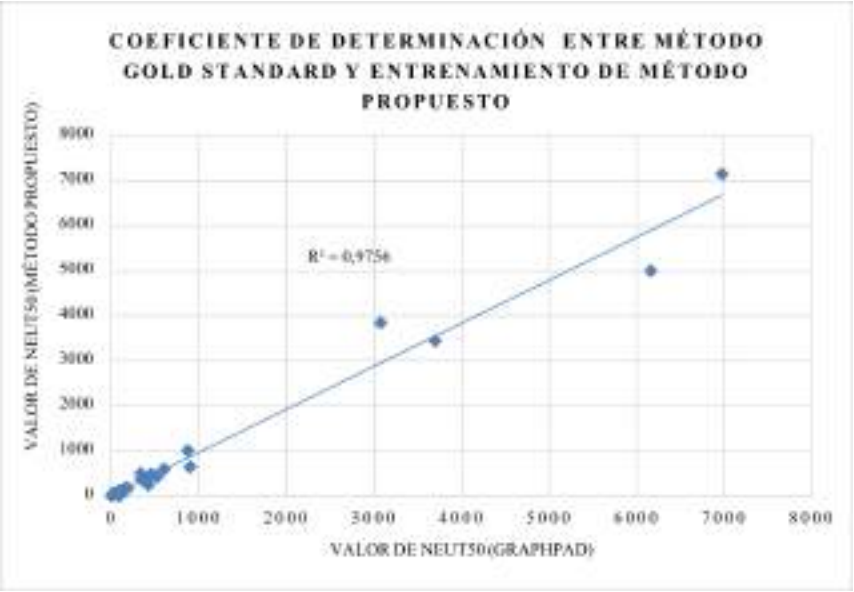


Figura 7.83: Gráfica de coeficiente de determinación entre valor de NEUT50 hallado con método gold standard y método propuesto en entrenamiento. Fuente: Elaboración propia.

Por último se determinó que el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores fue de 0,987 lo cual indica que es una correlación alta y positiva entre estos.

Además como se puede evidenciar en la tabla, el algoritmo clasifica por medio de un condicional la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes contra virus Dengue, en este caso las clases entre el método real y el propuesto coinciden en un 100 % de acuerdo al valor de NEUT50 calculado.

Posterior a la evaluación de ambos métodos se prosiguió a unir el código del modelo de clasificación de células en imágenes junto con el código modelo de regresión no lineal de 4 parámetros, para hallar así el resultado final de NEUT50 para cada uno de los grupos de imágenes correspondientes a las 13 muestras de evaluación.

Finalmente, como resultado de este objetivo se obtuvo la interfaz de usuario:

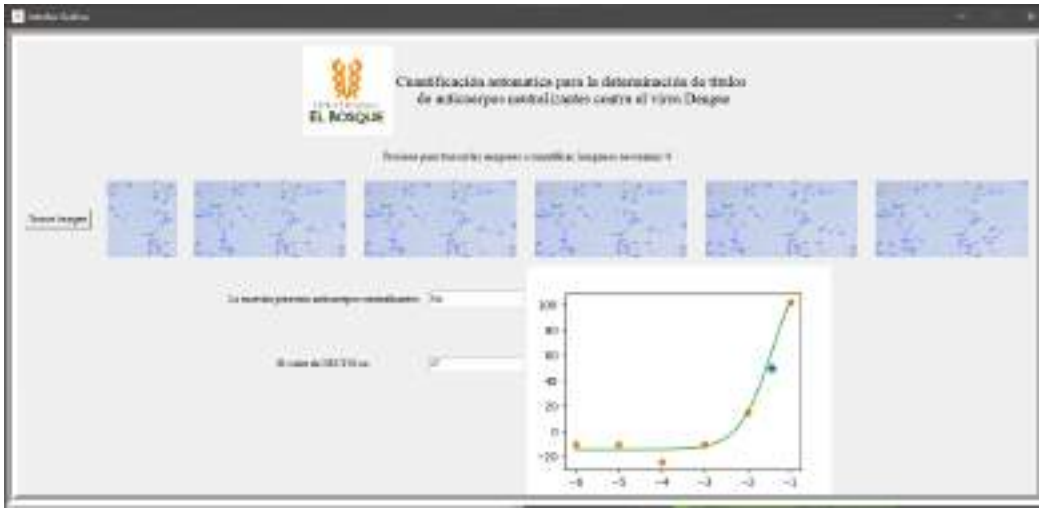


Figura 7.84: Interfaz de usuario. Fuente: Elaboración propia.

Por medio de la cual se pueden seleccionar las imágenes de las células capturadas (Se pueden seleccionar un total de hasta 8 imágenes para dilusiones y 2 para control), y así son ingresadas al software para realizar todo el procesamiento de la información. Una vez realizado este, se ilustra la curva sigmoidea realizada a partir de las muestras, además de esto se indica el valor de NEUT50, y se escribe si o no en caso de que el donante presente anticuerpos neutralizantes contra virus DENV.

7.4. Evaluación del método propuesto.

7.4.1. Evaluación del método de clasificación propuesto.

Se evaluó código realizado (ANEXO G) como el método final al clasificar células infectadas y no infectadas en las imágenes correspondientes a las 13 muestras establecidas en los requerimientos del proyecto (ANEXO H), por medio de una matriz de decisión y de allí se obtuvo los valores de Accuracy, F1-Score, Kappa, entre otros.

		Predicción	
Observación		Positivo	Negativo
	Positivos	586	19
	Negativos	7	5897

Cuadro 7.12: Matriz de confusión de clasificación de células infectadas y no infectadas en 13 muestras.

Con lo que se calcularon los índices de:

Índice	Valor
Precisión	0,996
Exactitud	0,907
Sensibilidad	0,998
Especificidad	0,968
F1-Score	0,997
Kappa	0,81

Cuadro 7.13: Índices de evaluación de método de clasificación de células.

Como se puede observar, los valores de precisión, sensibilidad, especificidad y F1-Score fueron los más cercanos a 1, siendo este valor el de un modelo ideal. Por otra parte el valor de exactitud también llamado Accuracy fue de 0,90, de lo cual se puede inferir que los valores calculados coinciden en un 90 % con respecto a los valores calculados por medio del método de referencia, pero se vió disminuido debido a la cantidad de falsos negativos clasificados por el algoritmo. Además de acuerdo a los valores de precisión y exactitud obtenidos que es un método reproducible y repetible.

Además, con el valor obtenido de Kappa (0,81) que es un valor que demuestra la concordancia entre conjunto de datos, respecto a lo que puede pasar de forma aleatoria, por tanto se puede inferir que hay una concordancia buena entre los valores base obtenidos por el método *gold standard* y los valores obtenidos por la metodología propuesta.

7.4.2. Evaluación del método al calcular NEUT50.

Siguiente a la evaluación del clasificador se evalúa el valor de NEUT50 hallado para cada muestra, como se ve en la siguiente imagen:

Figura 7.85: Gráfico comparativo de valor NEUT50 hallado con método de referencia y método propuesto. Fuente: Elaboración propia

Como se ve en el gráfico, de muestra vs valor de NEUT50, solo se presentan dos valores en los que se nota una diferencia entre el método propuesto y el método de referencia, los cuales son R80 y R206. Por tanto, estos valores fueron los causantes de aumentar el porcentaje de error del método.

Para la evaluación de este resultado se tomaron en cuenta los siguientes índices:

- Correlación de Pearson.
- Porcentaje de error.
- MSE.
- Coeficiente de determinación.

De lo cual se obtuvo los siguientes resultados:

Índice	Valor
Correlación de Pearson	0,9910
Porcentaje de error	18,7 %
MSE	314,4556
R^2	0,85

Cuadro 7.14: Índices de evaluación del método propuesto al calcular NEUT50.

Como se puede observar, el valor de correlación de Pearson demuestra que la relación que se tiene entre los dos conjuntos de valores obtenidos (método *gold standard* y el método propuesto) es alta y positiva (0,99) como se muestra en la (Fig. 7.86) mediante una matriz de correlación. Y es un método que cumple con los requerimientos establecidos ya que en el anteproyecto se indicó que el coeficiente de correlación entre los valores de NEUT50 entre el método *gold standard* y el propuesto debía ser mayor a 0,70, es decir una correlación alta y positiva. Además es importante destacar este valor ya que en las investigaciones médicas, con frecuencia interesa estudiar a partir de los datos de un grupo de individuos, la posible asociación entre dos variables.

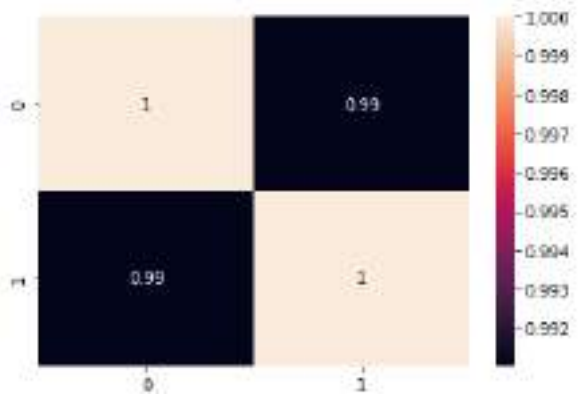


Figura 7.86: Matriz de correlación de valor NEUT50 hallados con método *gold standard* y método propuesto. Fuente: Elaboración propia

El error cuadrático medio del método fue de 314,45 y el porcentaje de error de 18,7 %, inferior al 20 % permitido según investigaciones relacionadas con componentes biológicos como lo son en este caso las células (Fallarero, Hanski & Vuorela, 2014). Por tanto, es un valor aceptado en estudios para determinar el adecuado desempeño del método planteado.

Se puede inferir que debido a que se realiza la conversión de valor de x0 a Neut50 por medio del logaritmo del valor inverso, se aumenta el error por los decimales que se emplean al momento de realizar la conversión, sin embargo un error del 18 % en diluciones seriadas en base 10 de 1 hasta 8, es decir en valores de un amplio rango de 10 hasta 10^8 que son las realizadas no tiene alta relevancia en los resultados ya que como son ensayos biológicos, no se obtiene un valor exacto de dilución sino una aproximación a este valor.

También, se calculó el coeficiente de determinación entre ambos métodos, que arrojó un valor de 0,85 (Fig. 7.87), que también se calcula de en un rango de 0 a 1, y cuanto más cerca el valor se sitúe a 1, mayor es el ajuste del modelo a la variable que se desea explicar. En este caso, a mayor cercanía al valor 1 presenten los resultados de la estimación del NEUT50 por el método de referencia y el algoritmo, mayor será el ajuste del modelo con respecto al *gold standard*.

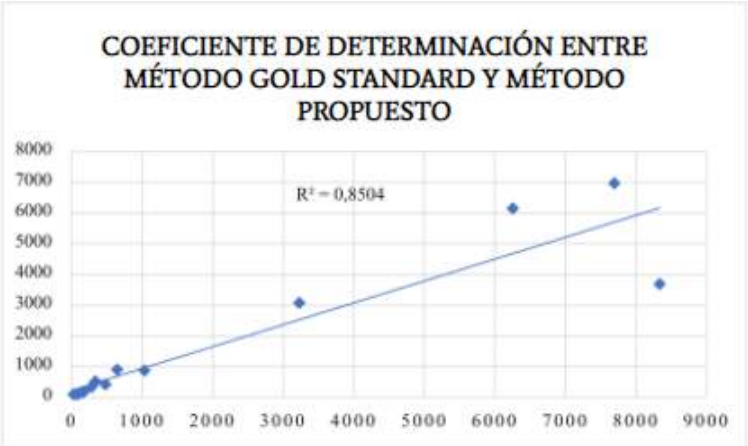
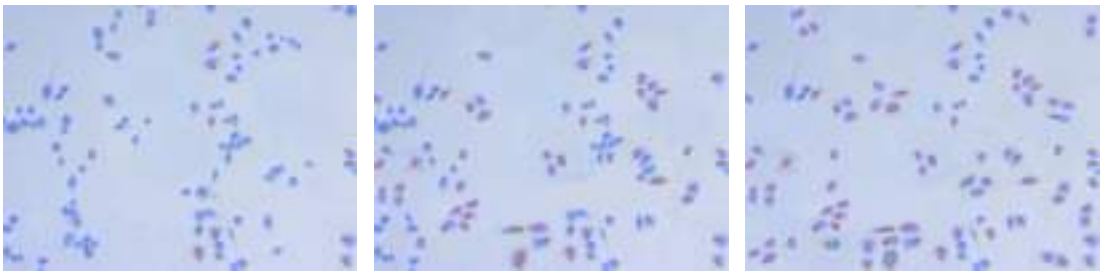


Figura 7.87: Coeficiente de determinación entre valor de NEUT50 hallado con método de referencia y método propuesto en entrenamiento. Fuente: Elaboración propia

Por último, de acuerdo a los índices calculados anteriormente y las pruebas realizadas con expertos se pudo observar que el método propuesto presentó un alto desempeño en cuanto a la clasificación y a la regresión, por medio de las cuales se obtuvieron resultados altamente correlacionados y similares al método de referencia.

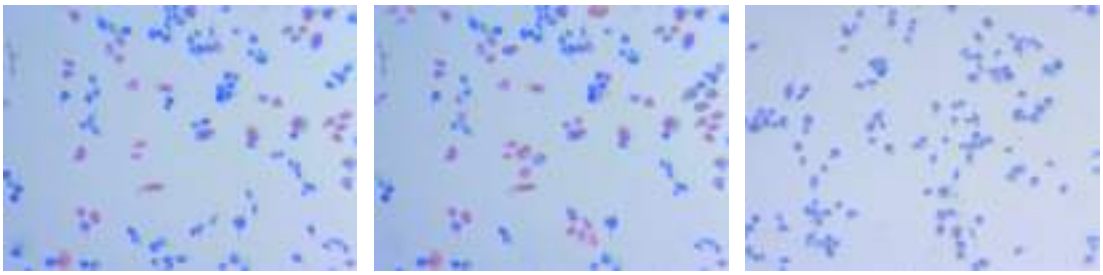
7.4.3. Evaluación del método cuantificar células en imágenes.

Se realizó una evaluación del conteo desarrollado por el método propuesto comparándolo con el conteo de células en la misma imagen de 4 expertos diferentes (ANEXO J). En esta evaluación se cuantificaron tanto de células totales dentro de una imagen como resultado de células infectadas y células no infectadas en 6 imágenes diferentes (Fig.7.88 y Fig.7.89).



(a) Imagen 1 (b) Imagen 2 (c) Imagen 3

Figura 7.88: Imágenes 1 a 3 utilizadas para la evaluación de la cuantificación por expertos y por método propuesto. Fuente: Elaboración propia



(a) Imagen 4 (b) Imagen 5 (c) Imagen 6

Figura 7.89: Imágenes 4 a 6 utilizadas para la evaluación de la cuantificación por expertos y por método propuesto. Fuente: Elaboración propia

Donde se obtuvo los siguientes resultados:

Imagen	Cuantificador	Ix	Ix Real	No Ix	No Ix Real	Total	Total Real
1	Experto	12	12	89	88	101	100
	Experto	12		84		96	
	Experto	12		87		99	
	Experto	12		87		99	
	Algoritmo	12		73		85	
2	Experto	50	50	56	50	106	100
	Experto	48		46		94	
	Experto	50		54		104	
	Experto	78		19		97	
	Algoritmo	52		43		95	
3	Experto	79	80	20	20	99	100
	Experto	73		18		91	
	Experto	77		20		97	
	Experto	78		19		97	
	Algoritmo	33		67		100	
4	Experto	38	38	85	72	123	110
	Experto	33		59		92	
	Experto	38		90		128	
	Experto	38		87		125	
	Algoritmo	36		75		111	
5	Experto	60	60	60	50	120	110
	Experto	45		48		93	
	Experto	62		61		123	
	Experto	60		61		121	
	Algoritmo	55		57		112	
6	Experto	1	1	145	149	146	150
	Experto	2		135		137	
	Experto	1		140		141	
	Experto	1		136		137	
	Algoritmo	1		148		149	

Cuadro 7.15: Cuantificación de 6 imágenes de células por expertos de laboratorio de Virología comparado con valores reales y obtenidos por el método propuesto. Fuente: Elaboración propia

A partir de los valores obtenidos en esta tabla, se hallaron los porcentajes de error de:

- Porcentaje de error humano al cuantificar células infectadas.
- Porcentaje de error humano al cuantificar células no infectadas.
- Porcentaje de error humano al cuantificar células totales.
- Porcentaje de error de algoritmo al cuantificar células infectadas.
- Porcentaje de error algoritmo al cuantificar células infectadas.
- Porcentaje de error algoritmo al cuantificar células infectadas.

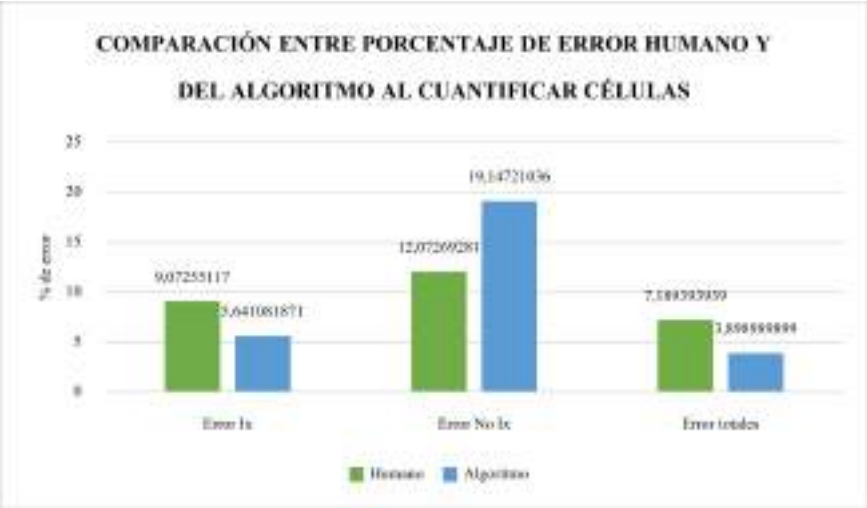


Figura 7.90: Comparación entre porcentajes de error humano y del código propuesto. Fuente: Elaboración propia.

Con la gráfica anterior, se puede inferir que los datos obtenidos por el método propuesto presentan un mejor desempeño al cuantificar células infectadas (5,64 %) y células totales (3,89 %), sin embargo al clasificar células no infectadas, presenta un mayor porcentaje de error (19,14 %) al humano (12,07 %), esto se debe a que la aglomeración celular es mejor identificada por un experto que por el algoritmo, afectando así el proceso de cuantificación. Además, el método identifica de mejor forma la cantidad de células infectadas ya que estas no se presentan en el mismo nivel de aglomeración que las no infectadas y debido a que la mayoría de características de clasificación son de color presenta un mejor desempeño.

Finalmente el error humano al cuantificar células se debe a que es un proceso repetitivo y visual que puede llegar a causar confusión tanto en los valores, porque se puede realizar el conteo de células de forma doble o ignorar algunas células (7,18 %), como en la clasificación de células por manchas en la imagen que se puedan confundir con marcación por sustrato cromogénico (9,07 %).

Sin embargo, el algoritmo también puede presentar errores al cuantificar la cantidad total debido a la eliminación o agregado de píxeles correspondientes a células lo que también aumenta el porcentaje de error presentando así un valor de 3,89 %.

7.5. Diseño detallado del prototipo.

Para el diseño detallado del hardware primero se realizó el diagrama funcional, el cual ve representado en la siguiente figura:

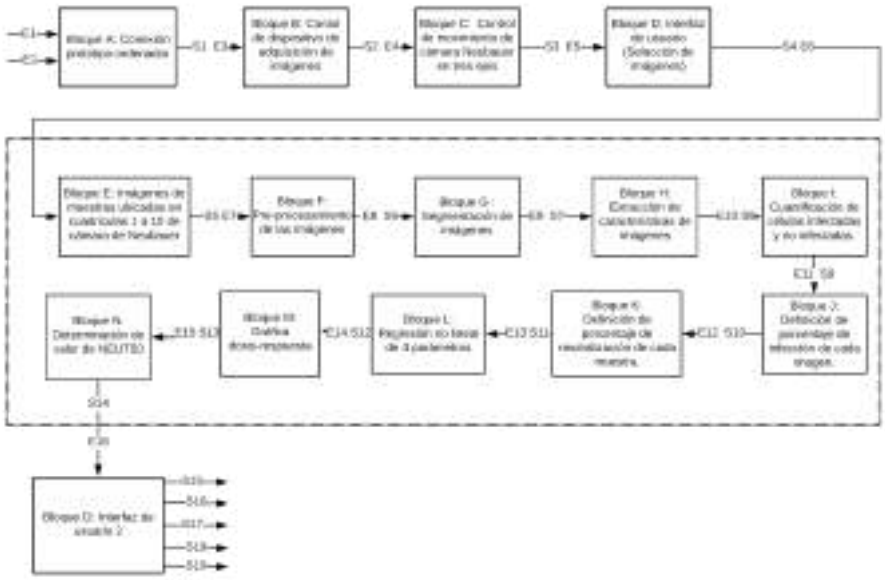


Figura 7.91: Diagrama funcional de prototipo. Fuente: Elaboración propia.

En el cual las entradas son energía eléctrica y la cámara de Neubauer y sus salidas son energía eléctrica, energía mecánica, la interfaz gráfica junto con la curva sigmoidea correspondiente al proceso realizado con el respectivo valor de NEUT50.

Siguiente a esto se realizó el proceso diseño del prototipo. Como primera parte a partir de matrices de decisión (ANEXO E) se definieron los componentes electrónicos y software indicados en la tabla 7.17.

Componente	Cantidad
Fusion360	1
ARDUINO UNO	1
Cámara microscópica	1
Luz LED blanca	1
Motor paso a paso NEMA 17	3
Driver A4988	3
Cnc Shield V3	1

Cuadro 7.16: Elección de componentes.

Figura 7.92: Cámara microscópica. Fuente: https://cutt.ly/vgOOna9

- Seguido de esto se realizó una búsqueda de diseños de máquinas CNC, en galerías en línea como Autodesk Online Galery, donde se eligió el diseño llamado CNC mashine from China (Zheigurov, 2016).
- Con el diseño elegido anteriormente de CNC, se modificó y desarrolló el prototipo esperado, añadiendo la cámara microscópica, el contenedor de la cámara de Neubauer, luces LED y la caja exterior de recubrimiento del prototipo (ANEXO B).

  El contenedor en acrílico transparente (Fig.7.93b) en el cual se ubica la cámara de Neubauer para posteriormente ser introducida al dispositivo. Se realiza con la finalidad de proteger la muestra en la cámara de Neubauer, garantizar la ubicación apropiada en el prototipo y evitar movimientos inesperados debido al movimiento de la plataforma.

  Siguiente a esto se puede observar la luz LED amarilla (Fig. 7.93c)que será ubicada debajo del lugar donde se ubica la cámara de Neubauer. Esta luz a su vez estará conectada a un circuito para la moderación de la intensidad de la luz (Dimmer), la cual podrá ser realizada por el usuario a través de los botones del circuito.

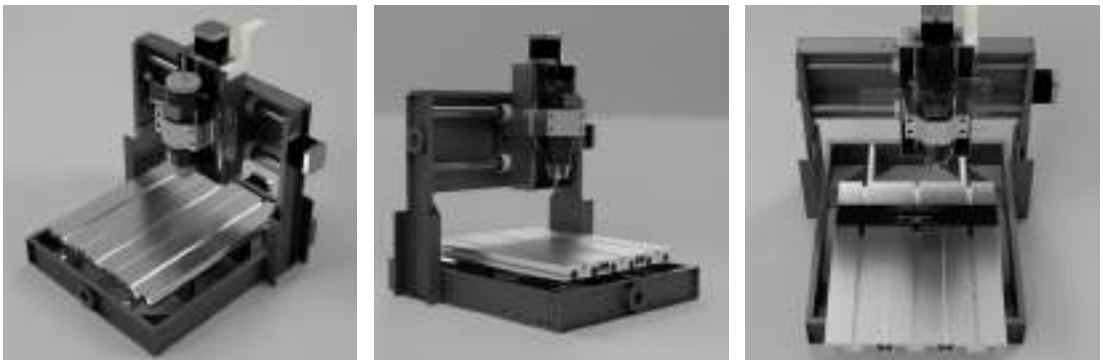
(a) Cámara microscópica

(b) Contenedor de cámara de Neubauer

(c) Cinta LED

Figura 7.93: Componentes añadidos a diseño de CNC. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360.

El diseño detallado del prototipo se ve representado en la figura 7.94 :



(a) Vista lateral superior derecha (b) Vista lateral superior derecha (c) Vista superior

Figura 7.94: Diseño detallado del prototipo. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360.

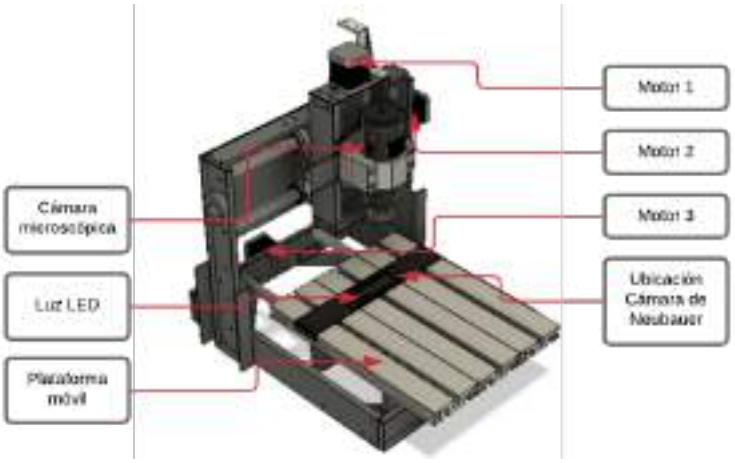


Figura 7.95: Partes de prototipo. Fuente: Elaboración propia en Fusion 360.

La plataforma móvil que se visualiza en la figura 7.95 es en la que se ubica la cámara de Neubauer y tiene la capacidad de moverse respecto al eje z, todo esto con el objetivo de acercarse a la puerta de la caja exterior y que así sea posible que el usuario ingrese el contenedor con la cámara de Neubauer en el lugar donde se ve indicado en la figura, y siguiente a esto reubicarse debajo de la cámara microscópica.

- Además se diseñó el recubrimiento externo del dispositivo, el cual presentará dos botones, uno rojo para encendido y apagado y otro azul para indicar el ingresó y la cámara de Neubauer al dispositivo por medio de la abertura ubicada en la parte inferior.

Figura 7.96: Diseño externo del prototipo. Fuente: Elaboración propia.

- Siguiente a este diseño se generó la simulación de movimiento y planos mecánicos y técnicos del prototipo, agregados como anexo al trabajo de grado (ANEXO C).
- Se realizó el diagrama de conexiones para el movimiento de los motores que se debe implementar (Fig.7.97). Se puede observar que los motores deben generar los diferentes movimientos en ejes x,y y z del prototipo. Además, se encuentran conectados al respectivo circuito, el cual contiene el microcontrolador Arduino, tres drivers de referencia A4988, y una celda de tipo CNC V3 la cual se conecta al microcontrolador. Para finalizar también contiene tres sensores de final de carrera los cuales permiten identificar los límites de movimiento de los motores.

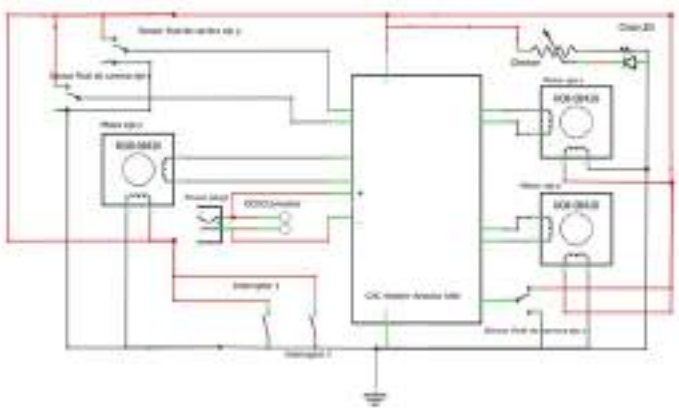


Figura 7.97: Esquemático de conexiones para el encendido del prototipo, movimiento de los motores y control de luz. Fuente: https://bit.ly/35XtxT9

- Todo este sistema de motores es controlado a través de la librería GRBL de Arduino (ANEXO G), un firmware especializado para máquinas CNC, que permite configurar y controlar el movimiento de los motores de manera mas fiable y precisa en cada uno de los ejes (ANEXO F). En el siguiente diagrama se demuestra el proceso paso a paso de la captura de las imágenes de las 10 rejillas de la cámara de Neubauer:

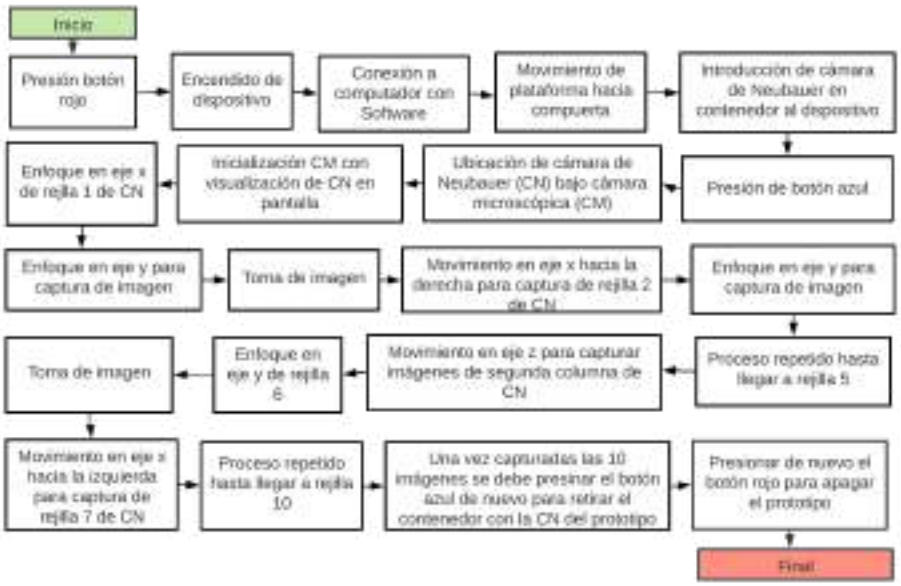


Figura 7.98: Diagrama de comando de motores para captura de imágenes. Fuente: Elaboración propia.

Una cámara de Neubauer de 10 rejillas presenta unas dimensiones de 84mm x 39 mm x 1mm. Para especificar el rango de movimiento de la cámara en cada una de las rejillas y a su vez en cada uno de los ejes se tuvo en cuenta el foco o punto focal de cada una de las rejillas señalados en color rojo en la imagen y dependiendo de este punto se toma la distancia hasta el punto de la siguiente rejilla. En este caso para el movimiento en el eje x de la cámara, el motor paso a paso deben mover su eje a un ángulo específico, con la finalidad de que se logre un desplazamiento de 15 mm hacia la derecha entre cada rejilla 1 a 5 de la cámara de Neubauer, o de 15 mm hacia la izquierda de las rejillas 6 a 10. Logrando un desplazamiento total en el eje x de aproximadamente 55 mm.

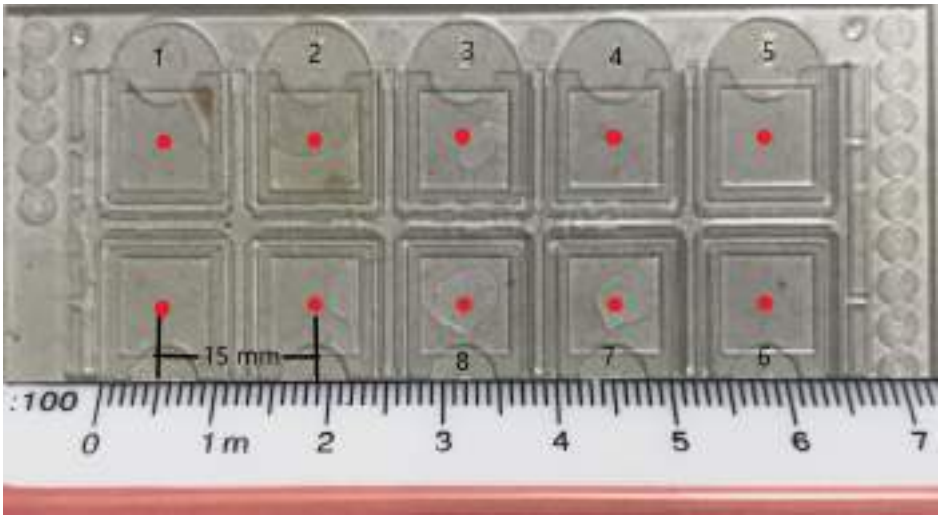


Figura 7.99: Movimiento en eje X de cámara. Fuente: Elaboración propia.

Siguiente a esto, en el movimiento del eje Z de la cámara, el motor paso a paso debe mover su eje a un ángulo específico, para que se logre un desplazamiento de 15 mm hacia abajo entre las dos columnas para el desplazamiento del foco de la rejilla 5 a la rejilla 6 (Figura 7.100).

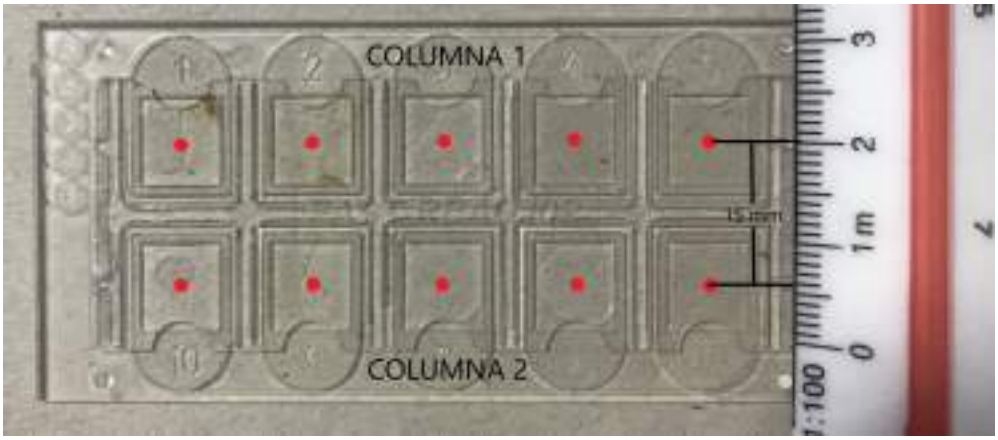


Figura 7.100: Movimiento en eje Z de cámara. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente el movimiento en el eje Y, el motor paso a paso debe mover su eje a un ángulo específico, para que se logre un desplazamiento de la cámara de captura de imágenes de tal forma que se alcance una distancia focal de 60mm. Es decir se debe ubicar la parte transparente de la cámara totalmente sobre la rejilla de la cámara de Neubauer. Como se ilustra en la siguiente imagen:

Figura 7.101: Movimiento en eje Y de cámara. Fuente: Elaboración propia.

- Finalmente se desarrolló un manual de usuario del prototipo, que se encuentra anexo al trabajo de grado (ANEXO D).

7.5.1. Diseño experimental de pruebas de cámara microscópica

El componente principal de este prototipo es la cámara microscópica (Figura 7.93a) de referencia Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01 (Figura 7.92), que tiene la capacidad de llegar a un zoom digital de 50x hasta 1000x el cual es el adecuado para simular un aumento de 40X en un microscopio (Aumento al que se visualizan las células en cámara de Neubauer), además de esto tiene una distancia focal de 3-60 mm que puede ser ajustada manualmente y un pixel de 3M. Esta cámara presenta sus comandos en el computador al que esté conectado el prototipo, para así capturar las imágenes. Fue elegida ya que cumple con los todos los requerimientos indicados en la tabla:

No. de requerimiento	**Requerimiento.**
R1	Tener un objetivo con la capacidad de captar y ampliar la imagen.
R2	Presentar un objetivo con la capacidad de ampliar de 10x a 1000x.
R3	Foco para iluminar la muestra con luz LED.
R4	Capacidad de regular la cantidad de luz en la muestra.
R5	Contener una base para mantener el dispositivo en posición estable.
R6	Presentar un brazo que conecte la base con el sistema óptico.
R7	Presentar conexión USB a computador para ser controlado por medio de software.
R8	Presentar una resolución media o alta, es decir mayor a 400 megapíxeles (La cual es más que suficiente para obtener buenos resultados en la medición y conteo) (Chirinos & Valencia, 2005).
R9	Permitir observar células de tamaño en el orden de 15 a 30 micras teñidas y fijadas.
R10	Capacidad de enfocar la muestra tras movimiento.
R11	Precio menor a microscopio óptico convencional y electrónico.
R12	Disponibilidad (Facilidad de compra y adquisición).
R13	Características de contraste, campo y distancia de trabajo.
R14	Cámara con sensor CMOS (Ya que dependiendo de este será la calidad de la imagen y su sensibilidad a la luz y son los sensores normalmente usados en cámaras para microscopio) (Webber, 2012; Amscope, 2019; Asthana et al., 2018)

Cuadro 7.17: Requerimientos de cámara microscópica.

Se realizaron pruebas en el Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque (Anexo K) para la verificación del funcionamiento adecuado de la cámara y la toma correcta de imágenes obteniendo como resultado las imágenes que se muestran en la Figura 7.104, las imagénes capturadas son de una placa de células fijadas y marcadas de referencia linea celular U937DC-SIGN utilizadas para la cuantificación y cualificación de la presencia o no del virus del Dengue dentro de una muestra.

Condiciones de toma de imágenes:

- Distancia focal en eje y de 60mm.
- Zoom óptico de aproximadamente 700x a 800x, que fue ajustado manualmente.
- Intensidad de luz LED máxima por parte de LEDs de cámara microscópica.
- Placa con células sobre una pantalla de luz LED blanca de uso de Laboratorio (También llamada Negatoscopio).

En la siguiente figura se demuestra la captura de las imágenes con la ubicación de la cámara adecuada:

Figura 7.102: Condiciones de captura de imágenes con cámara microscópica. Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo 16 imágenes (Anexo I) con dimensiones de 640x480 píxeles con una resolución de 96 PPP. Aunque estas imágenes no presentan la misma resolución que las imágenes sintéticas creadas en el dataset, el algoritmo de procesamiento de imágenes desarrollado en el proyecto se puede adecuar como trabajo futuro para el procesamiento de estas.

Algunas de estas son ilustradas en la siguiente figura:

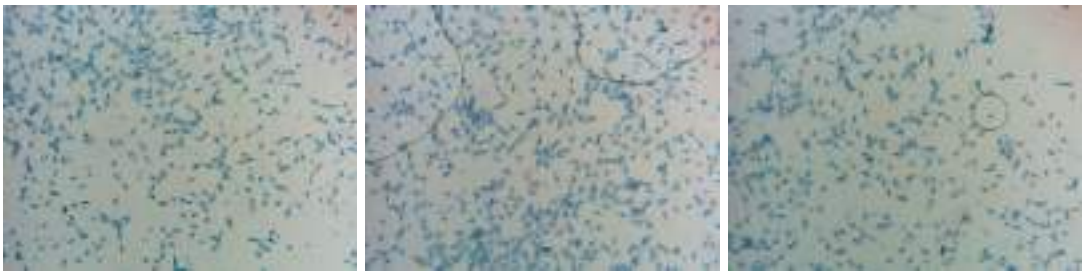


Figura 7.103: Imágenes de prueba capturadas con cámara microscópica propuesta (En estas imágenes se pueden visualizar núcleos de células U937DC-SIGN no infectadas fijadas y marcadas a una dilusión de 1:5). Fuente : Elaboración propia

Figura 7.104: Imágenes de prueba capturadas con cámara microscópica propuesta (En estas imágenes se pueden visualizar núcleos de células U937DC-SIGN no infectadas fijadas y marcadas a una dilusión de 1:10). Fuente : Elaboración propia

Además de esto se obtuvo imágenes de un portaobjetos milimetrado de referencia Reichert cat 1400, el cual es utilizado normalmente para la calibración de los microscopios dependiendo del tamaño de las células que se desean ver obteniendo el siguiente resultado.

Figura 7.105: Imágenes de prueba a portaobjetos milimetrado Fuente: Elaboración propia

De lo anterior, se puede afirmar que la cámara anteriormente propuesta, es capaz de tomar imágenes de células con un tamaño de 15 a 30 μm con una adecuada resolución (Figura 7.105), por lo cual tiene la capacidad de obtener imágenes de las células U937DC-SIGN (Con morfologías de monocitos, macrófagos y dendríticas), en las cuales es posible captar características de color y excentricidad de las células, que son los componentes principales extraídos por medio del código de procesamiento de imágenes propuesto en el proyecto.

Las imágenes capturadas también se encuentran en la carpeta de anexos del proyecto (Figura 7.104

y 7.103).

Las placas de células y milimétrica se ven en la siguiente imagen:

Figura 7.106: Placa milimétrica (Derecha). Placa con células (Izquierda). Fuente: Elaboración propia.

En la cual se puede notar que las células se encuentran en dos diluciones diferentes 1:5 y 1:10 lo que modifica la densidad celular, e igualmente se pueden visualizar con ayuda de la cámara microscópica. Además, la información en ambas placas no presenta la posibilidad de ser captada por medio del zoom óptico de una cámara no microscópica (Figura 7.107) , ni a simple vista del personal del laboratorio.

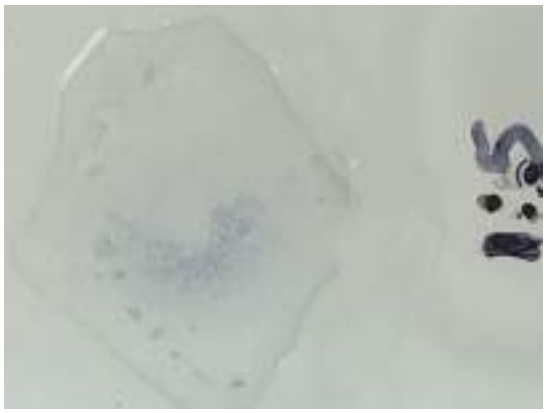


Figura 7.107: Imagen de placa con células capturada con cámara de teléfono celular de 12 MP y zoom máximo de 5X. Fuente: Elaboración propia.

A partir del diseño de este prototipo, se propuso un método de menor precio y dificultad técnica comparado con los otros métodos empleados actualmente (PRNT, Citometría de flujo), que potencialmente disminuye el error humano por medio de la cuantificación automatizada de células infectadas, y que realiza cálculos de conversión de células infectadas a títulos de anticuerpos neutralizantes en un solo paso, sin el uso de diferentes programas licenciados de alto costo (GraphPad, FlowJo), como se viene haciendo hasta ahora. De esta manera, el personal que realice la prueba usando este prototipo, lo hará usando un solo software (de producción original) para el usuario, que genera un ahorro en el tiempo de procesamiento de la información y la entrega de resultados. Adicionalmente, en comparación con un citómetro de flujo, el diseño físico del prototipo facilita su portabilidad y lo convierte en un equipo de fácil manipulación y transporte.

La siguiente figura indica el funcionamiento del método esperado a partir de cada uno de los componentes y procedimientos que se realizan para obtener el valor de NEUT50.

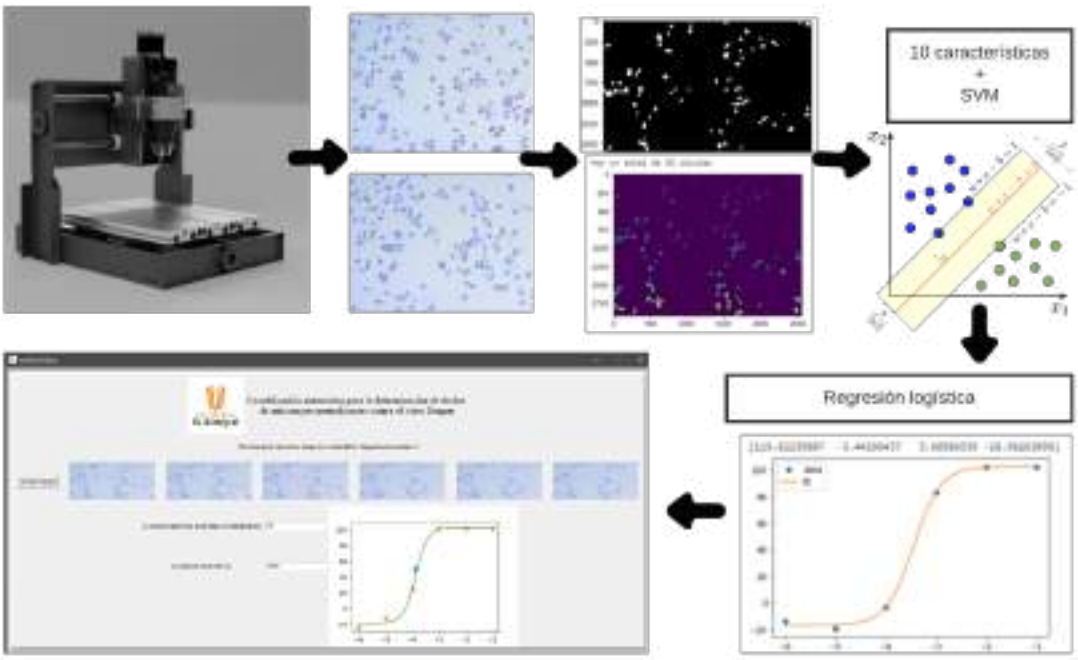


Figura 7.108: Funcionamiento del método final planteado. Fuente: Elaboración propia.

8. CONCLUSIONES

La alternativa de un método de visión de máquina aplicado al área de investigación mostró ser una herramienta de gran utilidad que permite apoyar el trabajo manual y visual en el laboratorio para la persona que realice las pruebas de cuantificación de NAbs. Además de que puede realizar la cuantificación automática de células, lo que evita el sesgo por parte de un profesional, y por medio de un software libre a través de una regresión logística permite desarrollar todos los cálculos que se llevan a cabo para hallar el valor de NEUT 50.

Los resultados experimentales utilizando el selector de características definieron aquellas características que mejor diferenciaban las clases de células infectadas y no infectadas, en este caso se empleó el método SFFS, a partir del cual se obtuvieron 10 características discriminantes (Desviación estándar RGB en el canal G, Mediana YCrCb en el canal Y, Media LAB en el canal L, Media LAB en el canal A, Mediana LAB en el canal L, Desviación LAB en el canal B, Desviación LUV en el canal L, Desviación LUV en el canal U, Media en escala de grises y Excentricidad) entre las clases con un Accuracy de 0,97.

Se utilizaron 6 diferentes modelos de clasificación binaria de las células, sin embargo, no todos presentaron el mismo rendimiento de clasificación, por lo que se eligió el modelo SFFS-SVM. El cual resultó ser efectivo ya que presentó un Accuracy de 0,90, un valor de 0,99 de F1-Score y un valor de beneficio/costo computacional de 55,64.

La presencia de outliers en los porcentajes de infección de las muestras causa una disminución en la exactitud del método planteado, debido a que aumenta significativamente el porcentaje de error de la regresión logística (18,7 %) con respecto al método de referencia en este caso el software GraphPad Prism. Sin embargo, el valor más importante a hallar es el de coeficiente de correlación de Pearson entre el valor de NEUT 50 calculado con ambos métodos (Gold standard y propuesto), que fue de 0,99, ya que en las investigaciones médicas, con frecuencia interesa estudiar a partir de los datos de un grupo de individuos, la posible asociación entre dos variables.

Como trabajo futuro plantea la construcción y validación del método y prototipo propuestos a través de pruebas realizadas en el laboratorio de investigación del grupo de Virología.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda buscar una alternativa en la cual el código requiera de menos tiempo computacional cuantificando los pixeles correspondientes a cada célula. Además de las características de área y excentricidad.

Por otra parte también se debe plantear una forma en la cual se realice un filtrado de outliers en la cuantificación del porcentaje de infección para prevenir el aumento en el porcentaje de error del método planteado.

Además, como complemento al software de procesamiento de imágenes, se podría agregar la opción de elección manual de células tanto infectadas como no infectadas, en caso de que se presenten manchas o ruido debido al sustrato cromogénico en las imágenes y se afecte la identificación y conteo de estas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, K., Banks, J., Chandran, V., Tomeo-Reyes, I. & Nguyen, K. (2018). Classification of White Blood Cell Types from Microscope Images:Techniques and Challenges. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/327931984_Classification_of_White_Blood_Cell_Types_from_Microscope_ImagesTechniques_and_Challenges.

Achelis, S. (2004). EL ANÁLISIS TÉCNICO DE LA A A LA Z (2nd ed.). Madrid: NETBIBLO.

Amscope (2019). 2160p 60fps HDMI Color CMOS C-mount Microscope Camera with 1.3 MP Photo-capture for Stand-alone and PC Imaging. Recuperado de: https://www.amscope.com/2160p\-60fps-hdmi-color-cmos-c-mount-microscope-camera.html

Álvarez, M., Valdés, D., Vázquez, S., Delgado, I., García, S., Morier, L., & Guzmán, M. (1998). Normalización de la técnica de reducción de placas para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601998000300001

Aritz Legarda, C. (2015). Calibración de sistemas de triangulación basados en cámaras Scheimpflug. Tesis de Doctorado. Mondragon Unibertsitatea. Mondragón, España.

Atanasova, M., Yordanova, G., Nenkova, R., Ivanov, Y., Godjevargova, T., & Dinev, D. (2019). Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 1-11. doi: 10.1080/13102818.2019.1593053

Asthana, V., Tang, Y., Ferguson, A., Bugga, P., Asthana, A., Evans, E. R., . . . Drezek, R. A. (2018). An inexpensive, customizable microscopy system for the automated quantification and characterization of multiple adherent cell types. PeerJ, doi: http://dx.doi.org.ezproxy.unbosque.edu.co/10.7717/peerj.4937

BARRERA RAMÍREZ, L., DRAGO SERRANO, M. E., PÉREZ RAMOS, J., SAINZ ESPUÑES, T, ZAMORA, A. C., GÓMEZ ARROYO, F., & MENDOZA PÉREZ, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17(1), 42-55.

Beita, J., Salazar, N., & Valverde, M. (2016). TEMA -2016: Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. Revisión de la literatura. Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR – HSJD, 6(2), 11–17.

Bearer E. L. (2003). Overview of image analysis, image importing, and image processing using freeware. Current protocols in molecular biology, Chapter 14, Unit–14.15. doi:10.1002/0471142727.mb1415s63

Bhavnani, L. A., Jaliya, U. K., & Joshi, M. J. (2016). Segmentation and counting of WBCs and RBCs from microscopic blood sample images. International Journal of Image, Graphics and Signal Processing, 8(11), 32. Recuperado de:http://ezproxy.unbosque.edu.co:2048/login?url=https://search-proquest-com.ezproxy.unbosque.edu.co/docview/1884174468?accountid=41311

Brand. (2019). Cámaras de recuento. Recuperado de https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_s.pdf

Brown, A. (2019). Medios cromogénicos: Bacteriología en color - Bioartis SRL v2. Recuperado de: https://cutt.ly/xfnLGwg

Bustamante, R. (2019). Diseño de un algoritmo para la automatización del conteo de células del

tejido sanguíneo mediante procesamiento digital de imágenes. Tesis para optar grado de Doctor en Ingeniería Industrial. Unidad de Posgrado, Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Bujang, M., & Baharum, N. (2016). Sample Size Guideline for Correlation Analysis. World Journal Of Social Science Research, 3(1), 37. doi: 10.22158/wjssr.v3n1p37

Bustillo, A. (2010). MÉTODO PARA CUANTIFICAR SUSPENSIONES DE ESPORAS DE HONGOS Y OTROS ORGANISMOS. doi: 10.13140/RG.2.1.3594.5128.

Cáceres, F., Vesga, C., Perea, X., Ruitorte, M., & Talbot, Y. (2009). Conocimientos, Actitudes y Prácticas sobre Dengue en Dos Barrios de Bucaramanga, Colombia. Revista de Salud Pública, 11(1), 27-38. Recuperado de :http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642009000100004&lng=es&tlng=es.

Cáceres, B., Castellanos, J., & Rodríguez, M. (2019). Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. Acta biol, 24(3), 439-451. DOI:http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79410

Carabali, M., Hernandez, L. M., Arauz, M. J., Villar, L. A., & Ridde, V. (2015). Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. BMC Infectious Diseases, 15(1). DOI: https://doi.org/10.1186/s12879-015-1058-x

Castellanos, J., & Velandia, M. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. REVISTA INFECTIO, 1,2.

Castrillón, J. C., Castaño, J. C. & Urcuqui, S. (2015). Dengue en Colombia: diez años de evolución. Revista chilena de infectología. Revista chilena de infectología. doi:10.4067/s0716-10182015000300002

California University, Berkeley. (2019). What is Bioengineering?. Recuperado de: https://bioeng.berkeley.edu/about-us/what-is-bioengineering

Cerda, J. Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Revista chilena de infectología, 29(2), 138-141. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003

Chawla, T., Chan, K., Zhang, S., Tan, H., Lim, A., Hanson, B., & Ooi, E. (2013). Dengue Virus Neutralization in Cells Expressing Fc Gamma Receptors. Plos ONE, 8(5), e65231. doi: 10.1371/journal.pone.0065231

Chen, Q., Meng, Z., Liu, X., Jin, Q. & Su, R. (2018). Decision Variants for the Automatic Determination of Optimal Feature Subset in RF-RFE. Genes. doi:10.3390/genes9060301

Chirinos, M., Valencia-Palomo, G. & Enseñat, J. (2005). Conteo Automático de Partículas y Medición Microscópica. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/282647209_Conteo_Automatico_de_Particulas_y_Medicion_Microscopica

Chitarroni, H. (2002). La regresión logística. Recuperado de: https://racimo.usal.edu.ar/83/1/Chitarroni17.pdf

Chy, T. & Rahaman, M. (2019) .ª Comparative Analysis by KNN, SVM & ELM Classification to Detect Sickle Cell Anemia,İnternational Conference on Robotics,Electrical and Signal Processing Techniques (ICREST), Dhaka, Bangladesh, 2019, pp. 455-459, doi: 10.1109/ICREST.2019.8644410.

Coll, J. (1993). Técnicas de diagnóstico en virología. Recuperado de: https://cutt.ly/bfnL8w4

Consejo Superior de Investigación Científica. (2015). Tipos de microscopía. Consejo Superior de Investigación Científica. Recuperado de: https://www.ipb.csic.es/servicios/Micro scopia/uploads/3/6 /2/2/3622788/microscopia_a_grandes_rasgos.pdf

Cohen, B., Doblas, D., & Andrews, N. (2008). Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. Vaccine, 26(50), 6392-6397. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.074

de Alwis, R., & de Silva, A. (2014). Measuring Antibody Neutralization of Dengue Virus (DENV) Using a Flow Cytometry-Based Technique. Dengue, 27-39. doi: 10.1007/978-1-4939-0348-1_3

Delgado, F. (2019). Neutralization test and DENV titration. Recuperado de: Comunicación personal, 27 de septiembre de 2019.

Dreiseitl, S., & Ohno-Machado, L. (2002). Logistic regression and artificial neural network classification models: a methodology review. Journal Of Biomedical Informatics, 35(5-6), 352-359. doi: 10.1016/s1532-0464(03)00034-0

Domínguez, D. R. (2016). Capítulo 9: Replicación del virus del dengue. En M. G. Guzmán. (Ed.), Dengue (pp. 118-123). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

El Tiempo. (2019). Preocupación por el aumento de enfermos de dengue. Recuperado de : https://www.eltiempo.com/salud/aumentan-enfermos-de-dengue-en-colombia-en-2019-323326

El Tiempo. (2019). Lanzan alerta regional por aumento de casos de dengue este año. Recuperado de: https://cutt.ly/pfnLJBd

Fallarero, A., Hanski, L., & Vuorela, P. (2014). How to Translate a Bioassay Into a Screening Assay for Natural Products: General Considerations and Implementation of Antimicrobial Screens. Planta Medica, 80(14), 1182-1199. doi: 10.1055/s-0034-1383061

Ferré, J. (2009). Regression Diagnostics. Comprehensive Chemometrics, 33-89. doi: 10.1016/b978-044452701-1.00076-4

Fuentes, O. (2016). Capítulo 11: Vectores del dengue. Transmisión e interacción virus-vector. En M. G. Guzmán. (Ed.), Dengue (pp. 154-165). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

Ford, A., & Roberts, A. (1998). Colour Space Conversions. Recuperado de: http://poynton.ca/PDFs/coloureq.pdf

González Betancourt, A., Rodríguez Ribalta, P., & Orozco-Morales, R. (2017). Marcadores para Segmentación Watershed Usando Transformada de Radon. Revista Cubana de Ciencias Informáticas, 11(1), 136-152.

Guzmán, M. G. (2016). Dengue (Ed). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

Gupta, V. & Bhavsar, A. (2017). Random Forest-Based Feature Importance for HEp-2 Cell Image Classification. I: Engineering Applications of Neural Networks (s. 922–934). Engineering Applications of Neural Networks. doi:10.1007/978-3-319-60964-580

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). Metodología de la Investigación. México: Mc Graw Hill.

Hulley, S., Cummings, S., Browner, W., Grady, D., Newman, T. (2013). Designing clinical research:

an epidemiologic approach. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. Appendix 6C, p. 79.

Ibraheem, N., Hasan, M., Khan, R., Mishra, P. (2012). Understanding Color Models: A Review. ARPN Journal of Science and Technology. 2. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/266462481_Understanding_Color_Models_A_Review

INS. (2019). Boletín epidemiológico semana 21 (pp. 1-17). Bogotá: Ministerio de Salud. Recuperado de: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019 %20Bolet %C3 %ADn % 20epidemiol %C3 %B3gico %20semana %2021.pdf

INS (2019). Boletín epidemiológico semana 39. Bogotá: Ministerio de Salud. Recuperado de: https://cutt.ly/ZfnLZyK

INS (2019). PROTOCOLO PARA LA VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA DEL DENGUE. Bogotá: Ministerio de Salud. Recuperado de : https://cutt.ly/rfnLZZk

Granitto, P., Furlanello, C., Biasioli, F., & Gasperi, F. (2006). Recursive feature elimination with random forest for PTR-MS analysis of agroindustrial products. Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems, 83(2), 83-90. doi: 10.1016/j.chemolab.2006.01.007

Jiménez, R. (1998). Metodología de la Investigación. Elementos básicos para la investigación clínica. La Habana : Ciencias Médicas.

Jiménez Camacho, E. (2009). Medición de distancias por medio de procesamiento de imágenes y triangulación, haciendo uso de cámaras de video. Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Electrónica y Comunicaciones. Departamento de Computación, Electrónica y Mecatrónica, Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla. Puebla, México.

Kavitha, K., Gopinath, A. & Gopi, M. (2017) .Ápplying improved svm classifier for leukemia cancer classification using FCBF,Ïnternational Conference on Advances in Computing, Communications and Informatics (ICACCI), Udupi, 2017, pp. 61-66, doi: 10.1109/ICACCI.2017.8125817.

Kaiser, G. (2019). 13.2E: Neutralization of Viruses. Recuperado de: https://cutt.ly/RfnLZ7v

Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., ... Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. Science (New York, N.Y.), 358(6365), 929–932. doi:10.1126/science.aan6836

Klasse, P. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. Recuperado de: https://www.hindawi.com/journals/ab/2014/157895/

Kalinin, A., Allyn-Feuer, A., Ade, A., Fon, G., Meixner, W., & Dilworth, D. et al. (2018). 3D Shape Modeling for Cell Nuclear Morphological Analysis and Classification. Scientific Reports, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-31924-2

Kleinbaum, D., & Klein, M. (2010). Logistic Regression. Statistics For Biology And Health. doi: 10.1007/978-1-4419-1742-3

Kretzschmar, A., & Gignac, G. (2019). At what sample size do latent variable correlations stabilize?. Journal Of Research In Personality, 80, 17-22. doi: 10.1016/j.jrp.2019.03.007

Kraus, A., Messer, W., Haymore, L., & de Silva, A. (2007). Comparison of Plaque- and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization. Journal Of Clinical Microbio-

logy, 45(11), 3777-3780. doi: 10.1128/jcm.00827-07

Kolkur, S., Kalbande, D., Shimpi, P., Bapat, C. & Jatakia, J. (2017). Human Skin Detection Using RGB, HSV and YCbCr Color Models. doi:10.2991/iccasp-16.2017.51

Lai, J. (2014) Automated Cell Counting and Characterization. Stanford University. California, USA. Recuperado de: https://stacks.stanford.edu/file/druid:cg133bt2261/Lai-Automatic-cell-counter-and-characterization.pdf

Lambeth, C., White, L., Johnston, R., & de Silva, A. (2005). Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. Journal Of Clinical Microbiology, 43(7), 3267-3272. doi: 10.1128/jcm.43.7.3267-3272.2005

Laredo, S., Guo, X., & Bocanegra, V. (2012). Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. Ciudad Victoria, México: CienciaUAT, 6(3), 27–33. Recuperado de : http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441942927002

Leica Microsystems. (s.f). Leica Microsystems. Obtenido de https:/ /www.leica-microsystems.com /es/productos/camaras-de-microscopia/

Leiva, J. (2007). EXTRACCION DE CARACTERÍSTICAS MEDIANTE CRITERIOS BASADOS EN TEORÍA DE LA INFORMACIÓN. (Tesis doctoral). UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID. Madrid, España.

Liljander, A., Meyer, B., Jores, J., Müller, M. A., Lattwein, E., Njeru, I., ... & Corman, V. M. (2016). MERS-CoV antibodies in humans, Africa, 2013–2014. Emerging infectious diseases, 22(6), 1086.

Longo, D. (2016). Capítulo 81e: Atlas de hematología y análisis de frotis de sangre periférica. En Kasper, D., Fauci, A., & Hauser, S. Harrison. Principios de medicina interna. Vol I y II (19th ed.). McGraw-Hill Interamericana.

López, R. F., Fernandez, J. M., Fernández, J. M. F. (2008). Las redes neuronales artificiales. Netbiblo.

Madabhushi, A., & Lee, G. (2016). Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. Medical Image Analysis, 33, 170-175. doi: 10.1016/j.media.2016.06.037

Manafi, M., Kneifel, W., & Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiological reviews, 55(3), 335–348.

Marsán Suárez, V., del Valle Pérez, L. O., Díaz Domínguez, G., & Macías Abraham, C. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 31(3), 242-253.

Martínez, E. (2016). Capítulo 19: Del dengue hemorrágico al dengue grave. En M. G. Guzmán. (Ed.), Dengue (pp. 253-260). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

Mattia, K., Puffer, B., Williams, K., Gonzalez, R., Murray, M., & Sluzas, E. et al. (2011). Dengue Reporter Virus Particles for Measuring Neutralizing Antibodies against Each of the Four Dengue Serotypes. Plos ONE, 6(11), e27252. doi: 10.1371/journal.pone.0027252

Mayorga Torres, J. M., Peña, B., Cadavid, A. P., Maya, C., & Walter, D. (2015). La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. Revista chilena de obstetricia y ginecología, 80(3), 265-268.

Microscopios Perú. (2019). Conteo en cámara de Neubauer [Imagen]. Rescatado de: https://www.facebook.com/MicroscopiosPeru/

Mishra, S., Majhi, B., Sa, P. K. & Sharma, L. (2017). Gray level co-occurrence matrix and random forest based acute lymphoblastic leukemia detection. Biomedical signal processing and control. Biomedical Signal Processing and Control. doi:10.1016/j.bspc.2016.11.021

Morales, M. (2012). Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica. Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. SIdI-UAM.

Morel, G. (2000). Hibridación in situ en microscopia óptica. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela.

Morais, A. (2015). Reconhecimento de Objetos Baseado em Visão Artificial (Tesis de maestría). UNIVERSIDADE DO PORTO. Oporto, Portugal.

Murillo, O. (2012). Desafíos en la prestación de servicios de salud en zonas rurales de Colombia. "Experiencia del proyecto malaria fondo mundial". Universidad Nacional De Colombia. Recuperado de: http://bdigital.unal.edu.co/7594/1/05599416.2012.pdf.

Mukaka M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi, 24(3), 69–71.

Muñoz, E. (2012). PRÁCTICA N4: ÇUENTA DE ERITROCITOS". Recuperado de: http://edurirom.blogspot.com/2012/03/practica-no-4-cuenta-de-eritrocitos.html

Nasi, M., De Biasi, S., Bianchini, E., Gibellini, L., Pinti, M., Scacchetti, T., Trenti, T., Borghi, V., Mussini, C. & Cossarizza, A (2015). Reliable and accurate CD4+ T cell count and percent by the portable flow cytometer CyFlow MiniPOC and "CD4 Easy Count Kit-Dry," as revealed by the comparison with the gold standard dual platform technology. PLOS ONE 10(1). doi: 10.1371/journal.pone.0116848

Núñez, H., Angulo, C., & Català, A. (2002, April). Rule extraction from support vector machines. In Esann (pp. 107-112).

Olachea, R. (2015). Reconocimiento y cuantificación de células de peces en imágenes de cortes histológicos. (Tesis de maestría). Instituto tecnológico de La Paz división de estudios de posgrado e investigación maestría en sistemas computacionales. La Paz, México. Recuperado de: http:/ /posgrado.lapaz.tecnm.mx/uploads/archivos/54cc2629740c2.pdf

OLYMPUS. (2019). Recuperado de: https://www.olympus-lifescience.com/es/solutions /fluorescenceimaging/

Orenstein, W. A., & Ahmed, R. (2017). Simply put: Vaccination saves lives. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(16), 4031–4033. doi:10.1073 /pnas.1704507114

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019). Dengue y dengue grave. Recuperado de: https://cutt.ly/GfnLBES

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009). DENGUE GUÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL. Geneva: WHO. Recuperado de: https://cutt.ly/gfnLNb3

Organización Panamericana de Salud (OPS) (2010). Dengue: Guía de atención para enfermo de la

región de las Américas. La Paz, Bolivia, p.6. Recuperado de: https://www.paho.org/hq/dmdocuments /2012/Guias-atencion-enfermos-Americas-2010-esp.pdf

Ortiz Zamora, F. G. (2002). Procesamiento morfológico de imágenes en color: aplicación a la reconstrucción geodésica (Tesis doctoral). Universidad de Alicante. Departamento de Física, Ingeniería de Sistemas y Teoría de la Señal. Alicante, España.

Padial, J. (2018). Regiones y dominios de una inmunoglobulina. "¿Qué tipos de anticuerpos hay en nuestro sistema inmune?". Recuperado de: https://curiosoando.com/que-tipos-de-anticuerpos-hay-en-nuestro-sistema-inmune

Palomino, N. C., & Concepción, L. (2010). Watershed: un algoritmo eficiente y flexible para segmentación de imágenes de geles 2-DE. Revista de investigación de Sistemas e Informática, 7(2), 36-41.

Paswan, S., & Kumar, Y. (2017). Detection and Classification of Blood Cancer from Microscopic Cell Images Using SVM KNN and NN Classifier. International Journal Of Advance Research, Ideas And Innovations In Technology, 3(6), 1-10.

Payne, S. (2017). Immunity and Resistance to Viruses. Viruses, 61–71. doi:10.1016/b978-0-12-803109-4.00006-4.

Pelaez, I. (2006). Modelos de regresión: lineal simple y regresión logística. Recuperado de: https://www.revistaseden.org/files/14-cap%2014.pdf

Peng, Y., Wu, Z. & Jiang, J. (2010). A novel feature selection approach for biomedical data classification. Journal of biomedical informatics. doi:10.1016/j.jbi.2009.07.008

Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. Current opinion in microbiology, 11(4), 369–377. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004

Peña-Peñate, A., Silva Rojas, L. G., & Alcolea Núñez, R. (2016). Módulo de filtrado y segmentación de imágenes médicas digitales para el proyecto Vismedic. Revista Cubana de Ciencias Informáticas, 10(1), 13-27.

Pértegas, S., & Pitas, S. (2002). Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. Recuperado de: https://www.fisterra.com/gestor/upload/guias /pearson2.pdf

Radke, R. (2009). Multi-View Geometry for Camera Networks. Multi-Camera Networks, 3-27. doi: 10.1016/b978-0-12-374633-7.00003-3

Rahimzadeganasl, A., & Sertel, E. (2017). Automatic building detection based on CIE LUV color space using very high resolution pleiades images. 2017 25th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU). doi:10.1109/siu.2017.7960711

Rockland Immunochemicals Inc (2019). Anti-Idiotypic Antibody. Recuperado de: https://rockland-inc.com/anti-idiotypic-antibody-production.aspx.

Rodríguez, R., & Gould, E. (2013). Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their Control. BioMed Research International, 1–20. https://doi.org/10.1155/2013/690835

Roy, M., Jin, G., Seo, D., Nam, M., & Seo, S. (2014). A simple and low-cost device performing blood cell counting based on lens-free shadow imaging technique. Sensors And Actuators B: Chemical, 201, 321-328. doi: 10.1016/j.snb.2014.05.011

Roane, T., Pepper, I., & Maier, R. (2009). Microscopic Techniques. Environmental Microbiology, 157-172. doi: 10.1016/b978-0-12-370519-8.00009-2

Rodríguez, F. (2019). El microscopio óptico - Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico. Rescatado de: https://www.franrzmn.com/el-microscopio-optico/

Sasaki, T., Setthapramote, C., Kurosu, T., Nishimura, M., Asai, A., & Omokoko, M. et al. (2013). Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. Antiviral Research, 98(3), 423-431. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.018

Salje, H., Rodríguez-Barraquer, I., Rainwater-Lovett, K., Nisalak, A., Thaisomboonsuk, B., & Thomas, S. et al. (2014). Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. Plos Neglected Tropical Diseases, 8(6). doi: 10.1371/journal.pntd.0002952

Salje, H., Cummings, D., Rodriguez-Barraquer, I., Katzelnick, L. C., Lessler, J., Klungthong, C., ... Cauchemez, S. (2018). Reconstruction of antibody dynamics and infection histories to evaluate dengue risk. Nature, 557(7707), 719–723. doi:10.1038/s41586-018-0157-4.

Salech, F., Mery, V., Larrondo, F., & Rada, G. (2008). Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados. Recuperado de: https://bit.ly/2ktO9yA

Schaefer, T., & Wolford, R. (2019). Dengue Fever. Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov /books/NBK430732/

Serna, E. (2017). Desarrollo e Innovación en Ingeniería (2nd ed., pp. 173-177). Medellín- Colombia: Editorial Instituto Antioqueño de Investigación.

Sevilla Drozdek, L. A. (2018). Optimización de la prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue serotipo 2. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Silva, L. (2018). Revise Microscópio Digital Zoom 1600X e 1000X [Video].

Srisha, R. & Khan, A. (2013). Morphological Operations for Image Processing : Understanding and its Applications.

Shirbani, F., & Soltanian, H. (2013). Fast SFFS-Based Algorithm for Feature Selection in Biomedical Datasets. Amirkabir International Journal Of Science Research (Electrical Electronics Engineering))AIJ-EEE), 45(2), 43-56.

Tomiyama, S., Sakata-Yanagimoto, M., Chiba, S. & Aikawa, N. (2018). Development of automatic classification system for leukocyte images using Random Forest. Electronics and communications in japan. Electronics and Communications in Japan. doi:10.1002/ecj.12113

The Native Antigen Company. (2019). "Visualizando la infección viral con microscopía de inmunofluorescencia". Recuperado de: https://thenativeantigencompany.com/visualising-viruses-with-immunofluorescence-microscopy/

Thermo Fisher Scientific. (2015). Conquer cell counting. Septiembre 28, 2019, de Thermo Fisher Scientific. Recuperado de: http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/countess-II-automated-cell-counters-brochure.pdf

Thomas, S., & Rothman, A. (2019). Dengue virus infection: Pathogenesis. Uptodate. Recuperado de: https://cutt.ly/6fnLMuq

Thomas, S., & Rothman, A. (2019). Dengue virus infection: Epidemiology. Uptodate. Recuperado de: https://cutt.ly/gfnLM1D

Thomas, S., Rothman, A., Srikiatkhachorn, A., & Kalayanarooj, S. (2019). Dengue virus infection: Clinical manifestations and diagnosis. Uptodate. Recuperado de: https://www.uptodate.com/contents/dengue-virus-infection-clinical-manifestations-and-diagnosis

Thomas, S., Jarman, R., Endy, T., Kalayanarooj, S., Vaughn, D., & Nisalak, A. et al. (2009). Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, 81(5), 825-833. doi: 10.4269/ajtmh.2009.08-0625

Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2018). Recent Developments in Recombinant Protein–Based Dengue Vaccines. Frontiers in Immunology, 9. Recuperado de: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01919

Ungaro, R., Abreu, M., & Fukata, M. (2009). Practical Techniques for Detection of Toll-Like Receptor-4 in the Human Intestine. Methods In Molecular Biology, 345-361. doi: 10.1007/978-1-59745-541-1_21

Vázquez, S., Domínguez, D., Guzmán, M.G. (2016). Capítulo 21: Diagnóstico de laboratorio. En M. G. Guzmán. (Ed.), Dengue (pp. 283-301). La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

Véliz Cardemil, G. S. (2013) "Validación de la cuenta total de leucocitos en frotis sanguíneo como alternativa de campo al uso del hemocitómetro en especímenes de salmo salar sanos". (Tesis de pregrado). Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Vera, M., Morejón, D., Roche, R., Diaz, L., & Tirado, M. (2013). Títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de individuos posconvalescientes con dengue. Revista Cubana de Medicina Tropical, 66(1). Recuperado de: http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/13/12

Violini, M. (2014). Selección de características. Su aplicación a clasificación de texturas. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Villeda, L., Macías, D., & Sáez, P. (2019). La FDA aprueba primera vacuna contra el dengue — Nación Farma. Recuperado de: https://nacionfarma.com/fda-primera-vacuna-contra-el-dengue/

Vivanco, V., Sandoval, O., Flores, J., Sánchez, B., & Águila, G. (2016). Diseño de un sistema clasificador de objetos en movimiento. Journal CIM, 4(1). Rescatado de:https://cutt.ly/xfnL5Ue

Viera, G. (2017). Procesamiento de imágenes usando OpenCV aplicado en Raspberry Pi para la clasificación del cacao (Tesis de licenciatura en Ingeniería Mecánico-Eléctrica). Universidad de Piura, Facultad de Ingeniería. Programa Académico de Ingeniería Mecánico-Eléctrica. Piura, Perú.

Warfield, B. (2020). What is CNC Machining and CNC Machines? [2020 Easy Guide]. Retrieved 14 September 2020, from https://www.cnccookbook.com/what-is-cnc-machining-and-cnc-machines/

Webber, K. (2012). CMOS: Listos para el Broadcast de hoy. Rescatado de: https://cutt.ly/TfnL6Nb

Wirth, M. (2004). Shape Analysis Measurement. Recuperado de: http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/micro2/content/education/wirth10.pdf

Yung, C. F., Lee, K. S., Thein, T. L., Tan, L. K., Gan, V. C., Wong, J., ... Leo, Y. S. (2015). Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, singapore. The American journal of tropical medicine and hygiene, 92(5), 999–1005. doi:10.4269/ajtmh.14-0628

Yusifli, E., Yahiaoui, R., Lajoie, I., & Yusifov, S. (2018). Embedded Cell Count Algorithm for Cultured Tissue Characterization. IFAC-Papersonline, 51(30), 683-687. doi: 10.1016/j.ifacol.2018.11.221

Zheigurov, S. (2016). CNC mashine from China. Recuperado de: https://gallery.autodesk.com/projects/73086/cnc-mashine-from-china

Zhu, G., Yan, B., Xing, M., & Tian, C. (2018). Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light. Journal Of Microbiological Methods, 153, 66-73. doi: 10.1016/j.mimet.2018.09.004

11. **ANEXOS**

ANEXO A. DATASET DE IMÁGENES SINTÉTICAS CREADAS. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO B. MODELO 3D DE PROTOTIPO. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO C. PLANOS TÉCNICOS DE PROTOTIPO. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO D. MANUAL DE USO DEL PROTOTIPO. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO E. MATRICES DE DECISIÓN Y SELECCIÓN DE COMPONENTES. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO F. VIDEO DE SIMULACIÓN DE MOVIMIENTO DE PROTOTIPO. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO G. CÓDIGOS EN PYTHON DE MÉTODO PLANTEADO. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO H. PRUEBAS DE CUANTIFICACIÓN DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VIRUS DENV REALIZADAS POR EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO I.IMÁGENES TOMADAS A PARTIR DE CÁMARA MICROSCÓPICA PROPUESTA. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO J.CUANTIFICACIÓN MANUAL DE CÉLULAS. Remitirse a los archivos adjuntos.
ANEXO K.PRUEBAS CON CÁMARA MICROSCÓPICA. Remitirse a los archivos adjuntos.

Resultados Convocatoria: "Brigada de Tecnologías UnBosque 2020"

O

OLIE <olie@unbosque.edu.co>
18:55

Para: gardilap@unbosque.edu.co Cc: JUAN CARLOS SUAREZ DELGADILLO; Maria Camila Duque Diaz; SARA SOFIA RONCANCIO HIGUERA

Estimados investigadores:

Tenemos el agrado de comunicarles que la tecnología postulada con el título *"Prototipo de visión de máquina para cuantificación automática de células suspendidas y marcadas con sustrato cromogénico en cámara de Neubauer para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus dengue"*, fue seleccionada dentro del grupo de las cinco tecnologías ganadoras con mayor potencial de protección de Propiedad Intelectual y potencial de Transferencia Tecnológica, en el marco de la **"Convocatoria: Brigada de Tecnologías UnBosque 2020"**, organizada por la Oficina Legal de Innovación y Extensión (OLIE) del HUB iEX y la Vicerrectoría de Investigaciones y con el soporte del Centro de Apoyo a la Tecnología y la Innovación (CATI-UEB).

La selección de las tecnologías se realizó a través del análisis técnico legal en materia de patentes y potencial de transferencia tecnológica a partir de la información proporcionada en el formulario de postulación. La difusión de ganadores se realizará en los próximos días, a través de los canales de comunicación oficiales de la Universidad, por lo que requerimos que nos proporcionen un contacto para comunicarnos y validar algunos datos sobre el título de la tecnología y nombres de los inventores.

Así mismo, nos estaremos comunicando nuevamente, la próxima semana, para validar algunos datos específicos de la tecnología, ya que al estar dentro de las tecnologías ganadoras iniciaremos en un proceso de búsqueda en el estado de la técnica que concluirá con la generación de un reporte que determinará la viabilidad de protección como patente, y según este resultado se revisarán las siguientes acciones a tomar.

Felicitamos gratamente el trabajo investigativo que han realizado y estamos muy orgullosos del potencial de desarrollo tecnológico institucional reflejado en casos como el postulado por ustedes.

Agradecemos su participación, quedamos atentos a cualquier duda o inquietud generada.

Cordialmente,

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

OFICINA LEGAL DE INNOVACIÓN Y EXTENSIÓN (OLIE)

PBX. (57-1) 6489000
Cra. 7B bis No.132 - 28
|Edificio HUB iEX| Bogotá D.C. | Colombia
www.unbosque.edu.co

ALTA CALIDAD
Resolución 013172 del 17 de Julio de 2020

Vigilada Mineducación

MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA DETERMINAR TÍTULOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VIRUS

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un método y dispositivo para determinar títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus.

Descripción del estado de la técnica

El estado de la técnica divulga métodos y dispositivos para determinar títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus. en los documentos US9513224B2, US4965725A, y US7177454B2.

El documento US9513224B2 divulga métodos, dispositivos, sistemas y aparatos descritos en este para análisis óptico y de imágenes o medición de muestras biológicas (Abstract).

Asimismo, éste documento divulga que en realizaciones particulares del sistema éste comprende un portamuestras que tiene una sección transparente que proporciona una reflexión la luz dentro del portamuestras, fuentes de luz y un detector óptico configurado para realizar mediciones de una muestra dentro del portamuestras.

Además, éste documento divulga que las medidas pueden incluir medidas cualitativas y medidas cuantitativas.

De igual forma, éste documento divulga que algunas realizaciones del sistema este puede incluir un aparato mecánico para ubicar, mover y ajustar el portamuestras y la fuente de luz.

Similarmente, éste documento divulga que el sistema puede incluir un microscopio al que se le se puede acoplar a un sensor de imagen para capturar imágenes generadas a través del objetivo del microscopio. En el sistema se pueden adquirir por microscopía múltiples imágenes de la muestra.

De forma similar, éste documento divulga que el portamuestras se puede mover con respecto al microscopio o el microscopio se puede mover con respecto al portamuestras para generar diferentes campos de visión para examinar diferentes porciones de la muestra en el portamuestras.

También, éste documento divulga técnicas de microscopía cuantitativa que pueden proporcionar información morfométrica sobre las células, que puede incluir el uso de técnicas de análisis de imágenes o métodos de clasificación y aprendizaje estadístico para procesar las imágenes obtenidas por microscopía.

De manera similar, éste documento divulga que se pueden medir múltiples atributos celulares diferentes durante la microscopía cuantitativa como por ejemplo, atributos físicos como tamaño de celda, volumen, conductividad, dispersión de ángulo alto/bajo y densidad, la circularidad de una célula o partícula; relación de aspecto de una célula o partícula; perímetro de una celda o partícula; convexidad de una célula o partícula; granularidad de una célula o partícula; intensidad de una imagen de una célula o partícula; altura (por ejemplo, tamaño a través de varios planos focales) de una célula o partícula; planitud de una célula o partícula; y otros atributos físicos.

Igualmente, éste documento divulga que se pueden medir mediante microscopía cuantitativa atributos morfológicos cómo área, tamaño y lobularidad de la célula; área, tamaño y lobularidad de la forma del núcleo; forma, área, tamaño y lobularidad de las mitocondrias; y relación entre el volumen nuclear y el volumen celular (párr. 0128 a 0131).

De la misma manera, éste documento divulga que se emplean otras técnicas de detección tal como un método basado en fluorescencia para enumerar células, para estimar la concentración celular en lugar de usar un contador celular. Esta estimación se describe porque, para una tinción precisa y reproducible de las muestras de los pacientes, a menudo es deseable que las tinciones (colorantes de ADN / anticuerpos / aglutinantes / etc.) se titulen de manera óptima para un número / concentración específicos de células (párr. 0139).

Por su lado, el documento US4965725A divulga un sistema y un método automatizados para la clasificación de muestras citológicas.

Asimismo, éste documento divulga que el método incluye un clasificador inicial para clasificar una muestra citológica y un clasificador secundario que tiene una red neuronal para clasificar las porciones de la muestra citológica seleccionada por el clasificador inicial.

De igual forma, éste documento divulga que en una realización particular, el clasificador primario puede emplear un microscopio automatizado disponible comercialmente en forma de un microscopio de citología estándar con una cámara de video con la platina del microscopio controlada para el escaneo automático de un portaobjetos.

De manera similar, éste documento divulga que las imágenes de la cámara de video se digitalizan y se envían al clasificador secundario que emplea una red neuronal y que se utiliza en la identificación de imágenes celulares.

También, éste documento divulga que el microscopio automatizado efectúa el movimiento relativo del objetivo del microscopio y la muestra, y la cámara de vídeo obtiene una imagen

o fotografía de una parte específica de la muestra citológica. La imagen es digitalizada por el digitalizador de imágenes y la información de la misma es llevada al clasificador.

Igualmente, éste documento divulga que en una realización preferida, el clasificador primario es un clasificador estadístico comercialmente que identifica los núcleos celulares de interés mediante la medición de su densidad óptica integrada (densidad de tinción nuclear).

De forma similar, éste documento divulga que esta densidad óptica integrada corresponde a la suma de los valores de gris de píxeles para el objeto, los cuales han sido corregidos de errores ópticos. Asimismo, éste documento precisa que en comparación con las células normales, las células malignas tienden a poseer un núcleo más grande y de tinción más densa.

Similarmente, éste documento divulga que un ejemplo del método el clasificador secundario toma una imagen de 50 pixeles por 50 pixeles que está comprimida y la procesa. Posteriormente, éste documento describe un ejemplo particular de las capas de entrada, salida y oculta de la red neuronal empleada en dicho clasificador incluyendo la rata de procesamiento de imágenes que puede alcanzar.

Asimismo, éste documento divulga una realización opcional en la que el clasificador primario tiene una red neuronal se utiliza en lugar de un sustituto de la clasificación morfológica y la clasificación de áreas para la detección de los tipos de células que son de interés, pero que no pueden detectarse por otros medios, y que en ese caso se minimiza la resolución requerida del clasificador.

De igual forma, éste documento divulga que en otra realización preferida, el clasificador primario está restringido a la evaluación del núcleo celular mientras que el clasificador secundario evalúa tanto el núcleo como el citoplasma circundante. Además, en otra realización, tanto el clasificador primario como el clasificador secundario están limitados a la evaluación de los núcleos celulares. Igualmente, éste documento divulga que la información de salida del clasificador secundario se envía a un monitor de salida y a una impresora, que pueden indicar una variedad de información que incluye, si alguna célula parece ser maligna o premaligna, parece requerir un examen más detenido, etc.,

Finalmente, el documento US7177454B2 divulga métodos y un aparato de análisis de imágenes de tejido automatizado para la detección de un trastorno proliferativo celular, e incluye en su alcance métodos de titulación de anticuerpos (Col. 5, líneas 32 a 47).

Asimismo, éste documento divulga que el propósito del aparato es el escaneo automático desatendido de portaobjetos de microscopio preparados para la detección y recuento de objetos de interés tales como células normales y anormales, por ejemplo, células tumorales.

De manera similar, éste documento divulga que un portaobjetos preparado con una muestra biológica y un reactivo se colocan en un portaobjetos que contiene cuatro portaobjetos. Los portaobjetos se cargan en un receptáculo de entrada del sistema automatizado. Después, un operador puede introducir datos que identifiquen el tamaño, la forma y la ubicación de un área de escaneo en cada portaobjetos o, el sistema localiza automáticamente un área de escaneo para cada portaobjetos.

De igual forma, éste documento divulga que el operador activa el sistema para el procesamiento de muestras. En la activación del sistema, se coloca un portaobjetos en una plataforma XY de un sistema óptico.

Similarmente, éste documento divulga que se escanea la muestra completa y en cada lugar del escaneo, se adquiere y procesa una imagen de bajo aumento para detectar posibles objetos de interés. Preferiblemente, el color, el tamaño y la forma se utilizan para identificar objetos de interés. Se almacena la ubicación de cada objeto de interés.

De la misma forma, éste documento divulga que además, se pueden usar portaobjetos de control para determinar la tinción de fondo. Por ejemplo, portaobjetos de control positivo para una técnica de tinción particular pueden procesarse seguidos de un control negativo para determinar un delta para los controles. El escaneo posterior en busca de objetos de interés puede diferenciar dichos objetos basándose en su color o intensidad por encima del delta.

Igualmente, éste documento divulga que el procesamiento de imágenes adquiridas en el escaneo automático incluye preferiblemente los pasos de transformar la imagen a un espacio de color diferente; filtrar la imagen transformada con un filtro de paso bajo; establecer dinámicamente un umbral de los píxeles de la imagen filtrada para suprimir el material de fondo; realizar una función morfológica para eliminar artefactos de la imagen del umbral; analizar la imagen de umbral para determinar la presencia de una o más regiones de píxeles conectados que tienen el mismo color; y categorizar cada región que tenga un tamaño mayor que un tamaño mínimo como un objeto de interés.

También, éste documento divulga que según otro aspecto de la invención, el área de escaneo se determina automáticamente escaneando el portaobjetos; adquirir una imagen en cada posición de la muestra; analizar la información de textura de cada imagen para detectar los bordes de la muestra; y almacenar las ubicaciones correspondientes a los bordes detectados para definir el área de escaneo (Col. 3 líneas 27 a 60).

Asimismo, éste documento divulga que el aparato comprende un subsistema de microscopio alojado en una carcasa. La carcasa incluye una tolva de entrada del portaobjetos y una tolva de salida del portaobjetos. Un subsistema informático comprende

una unidad de cómputo que tiene un procesador de sistema, un procesador de imágenes y un módem de comunicaciones.

De similar manera, éste documento divulga que el aparato incluye además una cámara CCD para adquirir imágenes a través del subsistema de microscopio. Un mecanismo de alimentación de portaobjetos automático junto con la plataforma XY proporciona un manejo automático de portaobjetos en el aparato. Una fuente de luz de iluminación proyecta luz sobre la platina XY que posteriormente se obtiene a través del subsistema de microscopio y se adquiere a través de la cámara CCD para procesar en el procesador de imágenes. La etapa AZ o etapa de enfoque bajo el control del controlador del microscopio proporciona el desplazamiento del subsistema del microscopio en el plano Z para enfocar.

Sin embargo, el estado de la técnica no divulga como disminuir el ruido durante el procesamiento de las imágenes que puede ocasionar falsos positivos o falsos negativos en el conteo de muestras.

Breve descripción de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus y dispositivos para obtener un dato de títulos de anticuerpo neutralizantes contra un virus.

Por ejemplo, el método para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus puede comprender una etapa para ejecutar en una unidad de cómputo una primera etapa de obtener un conjunto de imágenes con un dispositivo de captura de imágenes conectado a la unidad de cómputo de una máquina de control numérico ubicando secuencialmente el dispositivo de captura de imágenes y capturando una imagen de cada una de las rejillas de una cámara de Neubauer por medio de unos motores conectados eléctricamente a la unidad de cómputo y acoplados mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes. Este proceso permite capturar el conjunto imágenes de las muestras para realizarles el respectivo análisis del método para obtener el dato de títulos de anticuerpo neutralizante contra un virus.

Además, el método puede tener una etapa para aplicar una transformación morfológica con dilataciones y erosiones a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes. con el objetivo de disminuir el ruido en el conjunto de imágenes y así obtener una imagen sin ruido en la cual se realiza un proceso para obtener un dato morfológico que contiene la información de las características morfológicas que corresponde a el área y la excentricidad de cada una de las células que están en la imagen.

Además, el método puede tener una etapa para obtener un arreglo de datos de características discriminantes con el dato morfológico y el dato de color de acuerdo a un

dato de desempeño de un algoritmo de búsqueda de características; y obtener el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes al ejecutar un método de clasificación supervisada con el arreglo de datos de características discriminantes (204).

Sumado a esto, la presente divulgación se relaciona con un dispositivo para obtener un valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus, que comprende una máquina de control numérico que tiene una unidad de cómputo; una plataforma que tiene una cámara de Neubauer y una fuente de luz configurada para iluminar la cámara de Neubauer de acuerdo con una instrucción de la unidad de cómputo.

Además, el dispositivo para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus comprende un dispositivo de captura de imágenes con un campo de visión orientado hacia la cámara de Neubauer, en comunicación con la unidad de cómputo y configurado para capturar imágenes de las rejillas de la cámara de Neubauer de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo.

Particularmente, en una modalidad el dispositivo para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus puede tener un primer motor acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes y a la plataforma para proveer de movimiento axial longitudinal del dispositivo de captura de imágenes respecto a la cámara de Neubauer de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo; un segundo motor acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes y a la plataforma para proveer de movimiento axial transversal del dispositivo de captura de imágenes respecto a la cámara de Neubauer de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo; y un tercer motor acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes y a la plataforma para proveer de movimiento axial vertical del dispositivo de captura de imágenes respecto a la cámara de Neubauer de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo.

Adicionalmente, la unidad de cómputo está configurada para ejecutar los pasos del método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus.

Finalmente, el dispositivo para obtener un valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus tiene como ventaja técnica brindar al investigador un valor numérico de anticuerpo neutralizantes, una gráfica sigmoidea donde se muestran los puntos en cada una de las diluciones presentes en las muestras vs el título de anticuerpos y, por último, la confirmación de cual muestra contiene o no anticuerpos neutralizantes contra el virus.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 ilustra un diagrama de bloques de una modalidad del método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus.

La FIG. 2 ilustra un diagrama de flujo de una modalidad del método aquí divulgado, en la que se muestra una secuencia de pasos a), b), c), d) y e).

La FIG. 3 ilustra un diagrama de flujo de una modalidad del método aquí divulgado, en la que se muestra una secuencia de pasos de la etapa b)

La FIG. 4 ilustra una vista isométrica de una modalidad del dispositivo para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se relaciona con métodos implementados por computador para obtener un valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus, y dispositivos configurados para ejecutar estos métodos.

Por ejemplo, haciendo referencia a las FIGS 1, 2 y 4 el método implementado por computador para obtener un valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus,, que comprende ejecutar en una unidad de cómputo (11) comprende una etapa a) de obtener un conjunto de imágenes (201) con un dispositivo de captura de imágenes (4) conectado a la unidad de cómputo (11) de una máquina de control numérico (10) ubicando secuencialmente el dispositivo de captura de imágenes (4) y capturando una imagen de cada una de las rejillas de una cámara de Neubauer (5) por medio de unos motores (1, 2, 3) conectados eléctricamente a la unidad de cómputo (11) y acoplados mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4).

En cualquier modalidad, el dispositivo de captura de imágenes (4) puede cumplir con los siguientes requerimientos: tener un objetivo con la capacidad de captar y ampliar la imagen, presentar un objetivo con la capacidad de ampliar de 10x a 1000x; foco para iluminar la muestra con luz LED; presentar una resolución mayor a 400 megapíxeles y que permita observar células de tamaño en el orden de 15 a 30 micras teñidas y fijadas. Por ejemplo, en una modalidad el dispositivo de captura de imágenes (4) es un Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01, que tiene la capacidad de llegar a un zoom digital de 50x hasta 1000x el cual es el adecuado para simular un aumento de 40X en un microscopio, además de esto tiene una distancia focal de 3-60 mm que puede ser ajustada manualmente y un pixel de 3M. Esta cámara presenta sus comandos en la unidad de cómputo (11) al que esté conectado el Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01 para capturar las imágenes, con este Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01 es posible captar características de color y excentricidad de las células que son algunas de las características extraídas por el método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus.

Además, haciendo referencia a la FIG. 2, el método implementado por computador para obtener un valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus, puede incluir una etapa b) obtener un segundo conjunto de imágenes al aplicar una transformación morfológica que puede ser dilataciones y/o erosiones a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201) para disminuir el ruido de la imagen. Seguido a esto, obtener unos datos morfológicos (202) al aplicar un proceso de tratamiento de imágenes al segundo conjunto de imágenes. Dicho proceso de tratamiento de imágenes corresponde a realizar una marcación a través de conectividad para obtener el número total de células dentro de la correspondiente imagen, es decir, se obtiene cada uno de los píxeles que conforma una célula que se usa para obtener el dato morfológico (202).

En la presente divulgación se refiere a *"eliminar ruido", "disminuir ruido" "reducir ruido" o "sin ruido"* es reducir la intensidad entre pixeles vecinos, eliminar aquellos pixeles cuyo nivel de intensidad es muy diferente al de sus vecinos y cuyo origen puede estar tanto en el proceso de adquisición de la imagen como en el de transmisión.

El dato morfológico (202) puede comprender una matriz o un valor numérico que contiene la información de las características morfológicas que corresponde a el área y la excentricidad de cada una de las células que están en la imagen del conjunto de imágenes (201). Teniendo en cuenta que el área es la cantidad de pixeles que conforman la célula en la imagen y excentricidad es la relación entre la longitud del eje menor a la longitud del eje mayor de la célula en la imagen del conjunto de imágenes (201), el resultado es dado como un valor entre 0 y 1.

El área y excentricidad de cada una de las células se hallan por el proceso de tratamiento de imágenes que corresponde a realizar una marcación a través de conectividad para obtener el número total de células dentro de la correspondiente imagen, es decir, se obtiene cada uno de los píxeles que conforma una célula. En donde el área corresponde a la cantidad de pixeles que conforman la célula en la imagen y la excentricidad corresponde a la relación entre la longitud del eje menor a la longitud del eje mayor de la célula, el resultado de la excentricidad es dado como un valor entre 0 y 1.

En una modalidad la etapa b) puede obtener un segundo conjunto de imágenes al aplicar la transformación morfológica que corresponda a un proceso iterativo en el cual se realiza una dilatación y/o una erosión a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201). Seguido a esto, al segundo conjunto de imágenes a cada imagen se realiza una marcación a través de conectividad para obtener el número total de células dentro de la correspondiente imagen, es decir, se obtiene cada uno de los píxeles que conforma una célula que se usa para la obtención de excentricidad y área que son los valores del dato morfológico (202).

En cualquiera de las modalidades divulgadas de la presente invención, las transformaciones morfológicas pueden ser erosión, dilatación, apertura, cierre o combinaciones de estás.

Por ejemplo, en cualquier modalidad con el objetivo de disminuir el ruido de en la imagen del conjunto de imágenes (202) se halló un segundo conjunto de imágenes al aplicar una transformación morfológica, en la cual se realiza 12 iteraciones de erosión y 4 iteraciones de dilación con el objetivo de disminuir el ruido y poder detectar el número real de pixeles que conforma la célula en el proceso de tratamiento de imágenes.

Haciendo referencia a la FIG. 3, cualquier modalidad puede incluir un subproceso antes de realizar la o las transformaciones morfológicas que es realizar un filtrado de imágenes, para disminuir el ruido de la imagen, para obtener un dato morfológico (202) al aplicar una transformación morfológica con dilataciones y erosiones a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201).

Los filtros aplicados en las imágenes pueden ser filtros adaptativos, filtros paso bajo, paso alto, paso banda, filtros lineales, filtros no lineales, combinaciones de estos o similares conocidos por una persona medianamente versada en la materia. La ventaja al aplicar filtros a las imágenes es reducir la intensidad entre pixeles vecinos, eliminar aquellos pixeles cuyo nivel de intensidad es muy diferente al de sus vecinos y cuyo origen puede estar tanto en el proceso de adquisición de la imagen como en el de transmisión.

Por ejemplo, en una modalidad antes de las transformaciones morfológicas se puede convertir la imagen a escalas de grises para realizar una segmentación por umbralización de Otsu con el cual se elimina ruido y se convierte la imagen a una imagen binarizada. A la imagen binarizada se realiza unas transformaciones morfológicas de erosión y dilatación para obtener el valor con mayor exactitud en el proceso de tratamiento de imágenes que abarca el área correspondiente a cada una de las células presentes en la imagen.

Otro ejemplo, en una modalidad antes de las transformaciones morfológicas se puede convertir la imagen a espacio de color LAB para realizar un filtro gaussiano y una normalización del color gaussiano para eliminar el ruido. Para la segmentación se realiza la técnica de umbralización en espacio de colores, seguido a esto, se realizan unas transformaciones morfológicas de erosión y dilatación para obtener el valor con mayor exactitud que abarca el área correspondiente a cada una de las células presentes en la imagen.

Adicionalmente, la etapa b) se puede ejecutar secuencialmente a la etapa a) o periódicamente. Por ejemplo, en una modalidad, la etapa b) se ejecuta al finalizar la etapa a), es decir, de manera secuencial.

Por otro lado, el método puede incluir una etapa c) de obtener un dato de color (203) al aplicar una transformación de color a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201).

El dato de color (202) puede comprender una matriz o un valor numérico que contiene parámetros estadísticos de las características de color que son media, mediana, desviación estándar y varianza de cada uno de los espacios de color.

En cualquier modalidad en la etapa c) para la obtención de características de color la transformación de color puede corresponder a una transformación a un espacio de color que se puede seleccionar de los siguientes espacios de color:_RGB, Lab, HSV, YCrCb, XYZ, Luv, o escala de grises. Esta modalidad tiene la ventaja de ahorrar memoria en la unidad de cómputo (11) y disminuir tiempo de procesamiento.

Por otro lado, en la modalidad preferida en la etapa c) la transformación de color se realiza en los espacios de color:_RGB, Lab, HSV, YCrCb, XYZ, Luv, y escala de grises para la obtención de características de color. Esta modalidad tiene como ventaja un conjunto de datos más amplio que permite encontrar una diferencia entre los objetos presentes en la imagen y poder determinar si se está visualizando una célula marcada, es decir célula infectada, o no marcada, es decir célula sana.

En la modalidad preferida en la etapa c) el dato de color (203) puede corresponder a los parámetros estadísticos de media, mediana y desviación estándar de un conjunto de datos de color. Esta modalidad tiene como ventaja un conjunto de datos más amplio que permite obtener el valor de cada uno de los pixeles dentro de la célula, es decir se obtendrían gran cantidad de datos que representarían a la célula significativamente, a partir de estos datos representativos se puede realizar una discriminación entre células marcadas, es decir células infectadas, o células no marcadas, es decir células sanas, si se da una diferencia significativa en estos valores.

En una modalidad, en la etapa c) el dato de color (203) puede corresponder a un parámetro estadístico que puede ser: media, mediana o desviación estándar de un conjunto de datos de color. Esta modalidad tiene la ventaja de ahorrar memoria en la unidad de cómputo (11) y disminuir tiempo de procesamiento.

Por otro lado, en una modalidad del método la etapa b) y c) pueden ejecutarse paralelamente y en otra modalidad se pueden ejecutar secuencialmente.

Particularmente, el método puede tener una etapa d) de obtener un arreglo de datFos de características discriminantes (204) con el dato morfológico (202) y el dato de color (203) de acuerdo a un dato de desempeño de un algoritmo de búsqueda de características.

El algoritmo de búsqueda de características se puede seleccionar del método de análisis de componentes principales (PCA), eliminación de características recursivas (RFE) y búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS).

En cualquier modalidad, en la etapa d) el algoritmo de búsqueda de características puede ser algoritmo de búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS) para obtener un arreglo de datos de características discriminantes (204). Teniendo en cuenta que este algoritmo presenta un mejor comportamiento para problemas de tipo no lineal o que realiza la discriminación por medio de un método matemático diferente para obtener la menor cantidad de características discriminantes con el mejor desempeño para reducir el costo computacional del código.

En una modalidad en la etapa d) el algoritmo de búsqueda de características es el algoritmo de búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS), este algoritmo puede elegir entre 7 a 10 características de color y morfológicas con el objetivo de ahorrar costo computacional. Por ejemplo, en una modalidad el algoritmo de búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS) eligió 10 características para obtener el arreglo de datos de características discriminantes (204).

En cualquier modalidad de la divulgación, la etapa d) se puede ejecutar secuencialmente a la etapa c) y b) o se puede ejecutar periódicamente. Por ejemplo, en una modalidad la etapa d) se ejecuta cuando la etapa b) y la etapa c) finalicen, es decir, se ejecuta de manera secuencial.

Por otro lado, el método puede incluir una etapa e) de obtener el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes al ejecutar un método de clasificación supervisada con el arreglo de datos de características discriminantes (204) que tienen en cuenta transformaciones morfológicas con dilataciones y erosiones y una transformación de color.

Por consiguiente, el método de clasificación supervisada se selecciona en un proceso de prueba de clasificadores que toman el arreglo de datos de características discriminantes (204) y aplica una pluralidad de métodos de clasificación que se seleccionan entre Random Forest (RF), Maquina de Soporte Vectorial (SVM) y una Red neuronal (NN), de acuerdo con un resultado de rendimiento costo/beneficio del clasificador.

En la modalidad de preferencia en la etapa e) el método de clasificación es una Maquina de Soporte Vectorial (SVM) que utiliza un kernel gauss tipo rbf con el cual demuestra el mejor desempeño en la prueba de evaluación costo/beneficio y obtiene el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes con una exactitud de 0.97.

Preferiblemente, el proceso de clasificación supervisado es ejecutado por un servidor que se conecta con la unidad de cómputo (11) a través de un protocolo de comunicaciones.

El servidor puede ser un servidor web donde su arquitectura puede contar con dos APIs (Interfaz de programación de aplicaciones) que permiten la comunicación entre los elementos de la modalidad del sistema. En primer lugar, se cuenta con un API que respalda la conexión entre el servidor y el sistema computacional. Esta modalidad de arquitectura permite la obtención y almacenamiento de datos producidos en línea por la unidad de cómputo (11).

La segunda API puede permitir el intercambio de datos, tablas de datos, arreglos de datos, y bases o conjuntos de datos entre el algoritmo de aprendizaje supervisado y el arreglo de datos de características discriminantes (204). De esta manera, las modalidades del algoritmo de aprendizaje supervisado reciben por medio de la API información requerida por los mismos, la cual se encuentra almacenada en el arreglo de datos de características discriminantes (204)

Por otra parte, el servidor puede incluir un módulo de autenticación, cuya funcionalidad es permitir al usuario acceder a la modalidad del método divulgado y poder ejecutar las etapas descritas previamente en las modalidades de los métodos.

De esta manera, la presente divulgación presenta una ventaja en cuanto a la implementación de APIs, debido a que estos servicios permiten la interacción entre los dispositivos del sistema divulgado de manera constante. Gracias a la primera API se puede llevar a cabo la transmisión de información entre el servidor y la unidad de cómputo (11), lo cual permite obtener el valor de títulos de anticuerpos neutralizantes.

De esta manera, un efecto técnico generado por la modalidad del sistema divulgado es que el usuario puede verificar el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes.

Alternativamente, las APIs anteriormente mencionadas pueden reemplazarse por cualquier otro módulo de comunicaciones compuesto de herramientas y elementos de hardware y software configurados para establecer conexión entre el servidor y la unidad de cómputo (11). Por ejemplo, el servidor puede establecer comunicación con un servidor que administra remotamente la unidad de cómputo (11), mediante un protocolo de comunicaciones. Por ejemplo, se puede emplear un protocolo de comunicaciones basado en servicios, como RESTful, API REST, SOAP, o protocolos como HTTP, HTTPs, protocolos de comunicación IoT orientados a la interoperabilidad como el protocolo MQTT (MQ Telemetry Transport) y el protocolo AMQP (Advanced Message Queuing Protocol) y protocolos de comunicación orientados a ampliar el número de dispositivos en la red WAMP (Web Application Messaging Protocol), STOMP (Streaming Text Oriented Messaging Protocol, XMPP (Extensible Messaging and Presence Protocol), WMQ (WebSphere MQ). Además, el servidor puede comunicarse con la unidad de cómputo (11)

por uno o más protocolos de comunicaciones, por ejemplo, mediante protocolos de telefonía celular o internet móvil (v.g. EDGE/ GSM/ GPRS/ 3G/ 4G /5G).

Opcionalmente, cuando uno o más de las unidades de cómputo es un dispositivo computacional fijo, este puede comunicarse con el servidor por protocolos de comunicaciones tipo servidor-cliente, o protocolos de comunicaciones basados en servicios como los anteriormente descritos.

Por otra parte, el servidor puede ser un servidor centralizado, el cual permite el almacenamiento de archivos, información y datos compartidos entre servidores de computación a través de una red (v.g. una red local, red WAN, LAN, internet).

Una de las ventajas de dicha modalidad es que, al mantener los datos en un solo lugar, simplifica la manipulación y administración de los datos y la información almacenada. Es decir, en la modalidad del sistema divulgado al utilizar un servidor centralizado puede disminuir los costos computacionales, así como los tiempos de transmisión.

Por otro lado, haciendo referencia a la FIG 4, la presente divulgación también se relaciona con un dispositivo para obtener el valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus, que comprende una unidad de cómputo (11), que tiene una máquina de control numérico (10).

La unidad de cómputo (11) está configurada para ejecutar el método implementado por computador para obtener el valor de títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus, previamente mencionado en la presente divulgación.

De manera general se entiende que la unidad de cómputo (11) es un dispositivo que procesa datos, para la presente invención las unidad de cómputo puede ser por ejemplo, microcontroladores, micro procesadores, DSCs (Digital Signal Controller por sus siglas en inglés), FPGAs (Field Programmable Gate Array por sus siglas en inglés), CPLDs (Complex Programmable Logic Device por sus siglas en inglés), ASICs (Application Specific Integrated Circuit por sus siglas en inglés), SoCs (System on Chip por sus siglas en inglés), PSoCs (Programmable System on Chip por sus siglas en inglés), computadores, servidores, tabletas, celulares, celulares inteligentes, generadores de señales y unidades de cómputo conocidas por una persona medianamente versada en la materia y combinaciones de estas.

Por otro lado, la unidad de cómputo (11) puede incluir un módulo de comunicaciones configurado para establecer una conexión con un servidor. Teniendo en cuenta que la unidad de cómputo (11) envía el arreglo de datos de características discriminantes (204) al servidor y el servidor envía a la unidad de cómputo (11) los resultados del método de

aprendizaje supervisado para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus.

Los módulos de comunicaciones se seleccionan de un módulo de comunicación alámbrico, un módulo de comunicación inalámbrico y un módulo de comunicación alámbrico e inalámbrico.

Los módulo de comunicaciones inalámbricos usan una tecnología de comunicación inalámbrica que se selecciona del grupo conformado por Bluetooth Low Energy (BLE), WiFi, Radio Frecuencia RF ID (por las siglas en inglés de Radio Frequency Identification), UWB (por las siglas en inglés de Ultra Wide B-and), GPRS, Konnex o KNX, DMX (por sus siglas en inglés, Digital MultipleX), WiMax, LoRaWAN, Sigfox y tecnologías de comunicación inalámbricas equivalentes que sean conocidos por una persona medianamente versada en la materia y combinaciones de las anteriores.

Los módulo de comunicaciones alámbricos tienen un puerto de conexión cableada que permite la comunicación con los dispositivos externos mediante un bus de comunicaciones, el cual se selecciona entre otros, del grupo conformado por I2C (del acrónimo de IIC Inter-Integrated Circuit), CAN (por las siglas en inglés de Controller Area Network) , Ethernet, SPI (por las siglas en inglés de Serial Peripheral Interface), SCI (por las siglas en inglés de Serial Communication Interface), QSPI (por las siglas en inglés de Quad Serial Peripheral Interface), 1-Wire, US4965725AB (por las siglas en inglés de Domestic Digital Bus), Profibus, USB (Universal Serial Bus) y otros conocidos por una persona medianamente versada en la materia.

En la modalidad preferida el módulo de comunicación que conecta la unidad de cómputo (11) y el servidor por un dispositivo transmisor con estándar para comunicaciones inalámbricas de transmisión de datos de alta velocidad establecidos por tecnologías CDMA Acceso múltiple por división de código, HSDPA High-Speed Downlink Packet Access, OFDMA Orthogonal Frecuency Divison Mutiple Access y para áreas remotas servicio de comunicaciones satelitales.

Esta modalidad permite desarrollar las características de la tecnología IOT, que son el almacenamiento, análisis y visualización de información obtenida desde el registro de la imagen de la muestra por medio de la máquina de control numérico (10) y desde cualquier parte, teniendo un control total del registro de la muestra.

Por otra parte, la máquina de control numérico (10) puede comprender una plataforma (7) que tiene la cámara de Neubauer (5) y una fuente de luz (6) configurada para iluminar la cámara de Neubauer (5) de acuerdo con una instrucción de la unidad de cómputo (11).

Adicionalmente, la máquina de control numérico (10) puede tener el dispositivo de captura de imágenes (4) con un campo de visión orientado hacia la cámara de Neubauer, en comunicación con la unidad de cómputo (11) y configurado para capturar imágenes de las rejillas de la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11).

Teniendo en cuenta que en cada una de las rejillas de la cámara de Neubauer (5) está depositada una muestra de material biológico previamente procesada en un proceso de tinción.

Particularmente, la máquina de control numérico puede comprender tres motores: un primer motor (1) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial longitudinal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11); un segundo motor (2) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial transversal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11); y un tercer motor (3) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4)y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial vertical del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11).

Los motores pueden ser motor eléctrico seleccionado entre motores de corriente alterna (v.g. motores sincrónicos trifásicos, motores asíncronos sincronizados, motores con un rotor de imán permanente, motores monofásicos, motores bifásicos, motores con arranque auxiliar bobinado, motores con arranque auxiliar bobinado y con condensador), motores de corriente continua (v.g. motores de excitación en serie, motores de excitación en paralelo, motores de excitación compuesta), motores paso a paso (v.g. con encoder, con freno de motor, con disipadores de calor, con disipadores inerciales, con reductores de engranajes planetarios de una, dos o tres etapas), motores con cajas reductoras mecánicas, motores con cajas electromecánicas, motores reductores eléctricos, motores paso a paso clase NEMA 8, NEMA 11, NEMA 17, NEMA 23 o NEMA 34, y motores eléctricos equivalente conocidos por una persona medianamente versada en la materia, o combinaciones de los mismos.

EJEMPLO:

Se diseñó un dispositivo para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus, que comprende una máquina de control numérico (10) que tiene una unidad de cómputo (11), una plataforma (7) que es una base que soporta una cámara de Neubauer (5); y una fuente de luz (6) configurada para iluminar la cámara de Neubauer (5) de acuerdo con una instrucción de la unidad de cómputo (11).

Además, la base soporta un dispositivo de captura de imágenes (4) que es el Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01 con un campo de visión orientado hacia la cámara de Neubauer. El Microscopio Digital Usb 1000x Capilografo + Adaptador Otg YPC-X01 está en comunicación con la unidad de cómputo (11) y configurado para capturar imágenes de las rejillas de la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11).
Sumado a esto, la máquina de control numérico (10) tiene primer motor (1) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial longitudinal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11); un segundo motor (2) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial transversal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11); y un tercer motor (3) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4)y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial vertical del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11). Estos motores son motores paso a paso clase NEMA 8.

Por otro lado, la unidad de cómputo (11) está configurada para ejecutar los pasos del método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus de dengue.

Adicionalmente, la unidad de cómputo (11) se conecta con un dispositivo de visualización que es una pantalla LCD 7" táctil capacitivo multitoque, tipo TFT con interfaz DSI, resolución 1024 x 600 pixeles, profundidad de color 24 bits con conexión HDMI, con este dispositivo de visualización el usuario puede ver los resultados obtenidos del método implementado por computador que obtuvo el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de dengue.

Con la configuración anterior, se logró obtener el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de dengue en las muestras colocadas en la cámara de Neubauer (5).

Se debe entender que la presente invención no se halla limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, definido por las siguientes reivindicaciones.

GLOSARIO

Dato: Se entenderá en la presente divulgación por dato a una representación simbólica que puede ser numérica, alfabética, algorítmica, lógica, y/o vectorial que codifica información.

Un dato puede tener una estructura o trama compuesta de bloques de caracteres o de bits que representan diferentes tipos de información. Cada bloque se conforma de cadenas de caracteres, números, símbolos lógicos, entre otros.

También, un dato puede formarse sólo de bits (cadenas en lenguaje binario), formarse de caracteres formados uno a uno por una combinación de bits, formarse a partir de campos, registros o de tablas formadas de campos y registros, o formarse de archivos de intercambio de datos (formatos como csv, json, xls, entre otros). Además, un dato puede ser una matriz de *n* filas por *m* columnas. A su vez un dato puede contener varios datos.

Por ejemplo, cuando el dato tiene estructura de trama, la trama puede tener un bloque de caracteres de identificación, conocida generalmente como encabezado o "header", la cual contiene información relacionada con un dispositivo de cómputo o procesador que envía el dato, y puede contener información relacionada con un dispositivo de cómputo o procesador que recibe el dato. Preferiblemente, si el dato tiene un formato de trama, la trama contiene bloques relacionados con capas de acuerdo con el modelo de referencia OSI.

Extracción de características: Se entenderá en la presente divulgación por extracción de características que son valores representativos de las imágenes que permiten la identificación de patrones entre ellas para un posterior agrupamiento

Morfológicas: Se entenderá en la presente divulgación por morfológicas que son valores que describen la forma de un objeto y su similitud a valores parametrizables, como figuras geométricas ya descritas.

Área: Se entenderá por área como cantidad de pixeles que conforman un objeto en la imagen.

Excentricidad: Se entenderá por la excentricidad que es la relación entre la longitud del eje menor a la longitud del eje mayor de un objeto, el resultado es dado como un valor entre 0 y 1.

RGB: Se entenderá en la presente divulgación por RGB a un modelo que utiliza las componentes espectrales primarias rojo, verde y azul, así como un sistema de coordenadas cartesianas. El subespacio de este se representa mediante el tetraedro, en donde los colores RGB se sitúan en cada uno de los ejes, y los colores magenta, cyan y amarillo en los vértices restante.

HSV: Se entenderá en la presente divulgación por HSV que es una transformación no lineal del modelo RGB en coordenadas cilíndricas, en donde (Olanchea, 2015). En el cual H (matiz), representa un ángulo en grados con valores entre 0 y 360 grados, en donde cada

valor corresponde a un color. Por otra parte, S (saturación), representa la distancia al eje del brillo negro/blanco, tiene valores posibles de 0 a 100 %, y representa la pureza del color y finalmente V (valor), representa la altura en el eje blanco a negro, con el rango de valores posibles están entre 0 y 100

YCrCb: Se entenderá en la presente divulgación por YCrCb que es un espacio de color construido a partir de una suma ponderada de valores RGB. En el cual se almacena la información de luminancia (Y), y la información de crominancia se almacena como dos componentes de diferencia de color (Cb) que representa la diferencia entre el componente azul y el valor de referencia y (Cr) que representa la diferencia entre el componente rojo y un valor de referencia.

XYZ: Se entenderá en la presente divulgación por XYZ que todos los visibles los colores pueden ser definidos usando sólo valores positivos, y, el valor Y es la luminancia.

LUV: Se entenderá en la presente divulgación por LUV que es un modelo de color no lineal derivado del espacio XYZ. Sus siglas traducen a Luminosidad (L) , Saturación (U) y ángulo de luminosidad (V) además de esto los vectores U y V están relacionados a la crominancia de la imagen.

LAB: Se entenderá en la presente divulgación por LAB que es un modelo de color uniforme derivado del espacio XYZ con punto de referencia en el eje blanco a negro. Este espacio determina el color de acuerdo a la posición en tres dimensiones, los componentes (L) es la luminosidad del color en un rango de 0 a 100.

Dilatación: Genera que el objeto en la imagen aumente en área, el factor en que crece depende de la forma del elemento y la cantidad de iteraciones en las que se aplique.

Erosión: Es una operación complementaria a la dilatación, y genera que el objeto pierda su tamaño.

Segmentación: Se entenderá en la presente divulgación por segmentación que es una técnica de procesamiento de imágenes la cual subdivide una imagen en los elementos que la constituyen para ser separadas en los elementos y objetos de interés. La segmentación se puede dar de diferentes formas dependiendo del enfoque que se le desee dar.

Otsu: Se entenderá en la presente divulgación por Otsu técnica para realizar segmentación por medio del histograma en escala de grises de la imagen, siendo el eje X el nivel en la escala de grises que se presenta en el pixel y en el eje Y presenta la frecuencia con la cual aparece dicho color dentro de la imagen. A partir de esto selecciona el umbral optimo maximizando la varianza entre clases mediante una búsqueda exhaustiva, para poder hacer la diferenciación entre los elementos que se encuentren dentro de la imagen.

Marcación a través de conectividad: Se refiere al etiquetado de las células en la imagen que contienen características de conectividad

Título de anticuerpos neutralizantes: Valor que identifica y cuantifica la cantidad de anticuerpos neutralizantes específicos contra virus en la muestra de suero**.**

Clasificación supervisada: Decisión de un algoritmo computacional basado en inteligencia artificial el cual fue entrenado con información a priori de las clases a identificar.

Características discriminantes: Aquellas características que permiten diferenciar de mejor forma entre una clase y otra.

Máquina de soporte vectorial (SVM): Se entenderá en la presente divulgación por SVM como un algoritmo de aprendizaje automático supervisado que es empleado normalmente para clasificación lineal de forma binarizada esta metodología es llamada "hard-margin SVM", aunque también es empleado para la clasificación no lineal "soft-margin SVM". En este método se intenta encontrar los hiperplanos que producen la mayor separación entre los valores de la función de decisión para las instancias ubicadas en el límite entre dos clases.

Protocolo de comunicaciones: Se entenderá en la presente divulgación por protocolo de comunicaciones, como el conjunto de reglas formales que describen cómo transmitir o intercambiar datos, especialmente a través de una red. Un protocolo de comunicaciones estandarizado es aquel que ha sido codificado como estándar. Ejemplos de protocolos de comunicaciones estandarizados incluyen WiFi, el Protocolo de Internet y el Protocolo de transferencia de hipertexto (HTTP). Los protocolos de comunicaciones modernos dependen de otros protocolos en un modelo en capas conocido como pila. Cada capa de una pila se basa en las que están debajo y proporciona las capas de arriba. Por ejemplo, Internet funciona utilizando la pila TCP / IP, que se divide en cuatro capas.

Estos protocolos definen las reglas para enviar bloques de datos (cada uno conocido como unidad de datos de protocolo (PDU)) de un nodo en una red a otro nodo. Los protocolos normalmente se definen en capas y proporcionan todos o parte de los servicios especificados por una capa de una pila de protocolos. Una especificación de protocolo define el funcionamiento del protocolo y también puede sugerir cómo debe implementarse el protocolo.

Módulo de comunicaciones: Se entenderá en la presente invención por módulo de comunicaciones como un elemento de hardware acoplado una unidad de cómputo, unidad de procesamiento, o módulo de procesamiento de un dispositivo computacional o un

servidor, el cual permite establecer comunicación entre uno o más dispositivos computacionales o servidores para intercambiar datos, comandos y/o etiquetas.

Por ejemplo, el módulo de comunicaciones puede seleccionarse del grupo conformado por módulos de comunicaciones alámbricas, módulos de comunicaciones inalámbricas y módulos de comunicaciones alámbricas e inalámbricas.

Ejemplos de módulos de comunicaciones inalámbricas usan una tecnología de comunicación inalámbrica que se selecciona del grupo conformado por Bluetooth, WiFi, Radio Frecuencia RF ID (por las siglas en inglés de Radio Frequency Identification), UWB (por las siglas en inglés de Ultra Wide Band), GPRS, Konnex o KNX, DMX (por sus siglas en inglés, Digital MultipleX), WiMax y tecnologías de comunicación inalámbricas equivalentes que sean conocidos por una persona medianamente versada en la materia y combinaciones de las anteriores.

Ejemplos de módulos de comunicaciones alámbricas tienen un puerto de conexión cableada que permite la comunicación con los dispositivos externos mediante un bus de comunicaciones, el cual se selecciona entre otros, del grupo conformado por I2C (del acrónimo de IIC Inter-Integrated Circuit), CAN (por las siglas en inglés de Controller Area Network) , Ethernet, SPI (por las siglas en inglés de Serial Peripheral Interface), SCI (por las siglas en inglés de Serial Communication Interface), QSPI (por las siglas en inglés de Quad Serial Peripheral Interface), 1-Wire, US4965725AB (por las siglas en inglés de Domestic Digital Bus), Profibus y otros conocidos por una persona medianamente versada en la materia, y combinaciones de los mismos.

Servidor: Se entenderá en la presente invención por servidor un dispositivo que tiene una unidad de procesamiento configurada para ejecutar una serie de instrucciones correspondientes a etapas o pasos de métodos, rutinas o procesos. El servidor puede instalar y/o ejecutar un programa de computador que puede estar escrito en Java, Javascript, Perl, PHP y C++, #C, Python, SQL, Swift, Ruby, Delphi, Visual Basic, D, HTML, HTML5, CSS, y otros lenguajes de programación conocidos por una persona medianamente versada en la materia.

Además, el servidor tiene un módulo de comunicaciones que permite establecer conexión con otros servidores o dispositivos computacionales. Adicionalmente, los servidores pueden conectarse entre sí, y conectarse con otros dispositivos computacionales a través de arquitecturas de servicios web y comunicarse por protocolos de comunicaciones como SOAP, REST, HTTP/HTML/TEXT, HMAC, HTTP/S, RPC, SP y otros protocolos de comunicaciones conocidos por una persona medianamente versada en la materia.

Similarmente, los servidores mencionados en el Capítulo Descriptivo de la presente invención pueden ser interconectarse a través de redes como la internet, redes VPN, redes

LAN, WAN, otras redes equivalentes o similares conocidas por una persona medianamente versada en la materia y combinaciones de las mismas. Estas mismas redes pueden conectar uno o más dispositivos computacionales o terminales a uno o más servidores.

Algunos de los servidores mencionados en el Capítulo Descriptivo de la presente invención pueden ser servidores virtuales o servidores web. Cualquiera de los servidores de la presente invención puede incluir un módulo de memoria configurado para almacenar instrucciones que al ser ejecutadas por el servidor ejecute una parte, o la totalidad de una o más etapas de cualquiera de los métodos aquí divulgados.

En algunas modalidades de la presente invención, uno o más de los servidores pueden ser servidores físicos o servidores virtuales con una arquitectura de respaldo o arquitectura en clúster en la cual se tienen uno o más servidores de reemplazo configurados para garantizar alta disponibilidad.

Aprendizaje supervisado: Se entenderá en la siguiente divulgación por aprendizaje supervisado como un conjunto de técnicas que permite realizar predicciones futuras basadas en comportamientos o características analizadas en datos históricos etiquetados. Teniendo en cuenta que una etiqueta no es más que la salida que ha mostrado el conjunto de datos para datos históricos, ya conocidos.

La predicción obtenida es representada por medio de una función donde las entradas representan las características analizadas y la salida representa la variable que se quiere predecir. Esta función de salida es de tipo numérico en problemas de regresión y de tipo categórico en los problemas de clasificación.

API: interfaz de programación de aplicaciones que provee acceso a funciones de un software.

API REST: interfaz de programación de aplicaciones que provee acceso a funciones de un software a través de representaciones textuales de recursos web.

REIVINDICACIONES

1. Un método implementado por computador para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus, que comprende ejecutar en una unidad de cómputo (11) las siguientes etapas:

a) obtener un conjunto de imágenes (201) con un dispositivo de captura de imágenes (4) conectado a la unidad de cómputo (11) de una máquina de control numérico (10) ubicando secuencialmente el dispositivo de captura de imágenes (4) y capturando una imagen de cada una de las rejillas de una cámara de Neubauer (5) por medio de unos motores (1, 2, 3) conectados eléctricamente a la unidad de cómputo (11) y acoplados mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4);

a) obtener un segundo conjunto de imágenes al aplicar una transformación morfológica con dilataciones y erosiones a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201) y obtener unos datos morfológicos (202) al aplicar un proceso de tratamiento de imágenes al segundo conjunto de imágenes;

b) obtener un dato de color (203) al aplicar una transformación de color a cada una de las imágenes del conjunto de imágenes (201);

c) obtener un arreglo de datos de características discriminantes (204) con el dato morfológico (202) y el dato de color (203) de acuerdo a un dato de desempeño de un algoritmo de búsqueda de características; y

d) obtener el dato de títulos de anticuerpos neutralizantes al ejecutar un método de clasificación supervisada con el arreglo de datos de características discriminantes (204).

2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en cada una de las rejillas de la cámara de Neubauer (5), ha sido depositada una muestra de material biológico previamente procesada en un proceso de tinción.

3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa b) la transformación morfológica corresponde a un proceso iterativo en el cual se realiza una dilatación y/o una erosión.

4. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa c) la transformación de color corresponde a una transformación a espacios de color que se realiza en los espacios de color:_RGB, Lab, HSV, YCrCb, XYZ, Luv, o escala de grises.

5. El método de acuerdo con la Reivindicación 3, donde en la etapa c) el dato de color (203) corresponde a un valor de media, mediana o desviación estándar de un conjunto de datos de color.

6. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde en la etapa d) el algoritmo de búsqueda de características se selecciona de método de análisis de componentes

principales (PCA), eliminación de características recursivas (RFE) y búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS).

7. El método de acuerdo con la Reivindicación 6, en donde en la etapa e) el algoritmo de búsqueda de características es el algoritmo de búsqueda flotante secuencial hacia adelante (SFFS).

8. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa e) el método de clasificación supervisada se selecciona en un proceso de prueba de clasificadores que toman el arreglo de datos de características discriminantes y aplica una pluralidad de métodos de clasificación que se seleccionan entre Random Forest (RF), Maquina de Soporte Vectorial (SVM) y una Red neuronal (NN), de acuerdo con un resultado de rendimiento costo/beneficio del clasificador.

9. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa e) el método de clasificación es Maquina de Soporte Vectorial (SVM).

10. Un dispositivo para obtener un dato de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un virus, que comprende:

- una máquina de control numérico (10) que tiene:
- una unidad de cómputo (11);
- una plataforma (7) que tiene:
- una cámara de Neubauer (5); y
- una fuente de luz (6) configurada para iluminar la cámara de Neubauer (5) de acuerdo con una instrucción de la unidad de cómputo (11);
- un dispositivo de captura de imágenes (4) con un campo de visión orientado hacia la cámara de Neubauer, en comunicación con la unidad de cómputo (11) y configurado para capturar imágenes de las rejillas de la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11);
- un primer motor (1) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial longitudinal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11);
- un segundo motor (2) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4) y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial transversal del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11); y
- un tercer motor (3) acoplado mecánicamente al dispositivo de captura de imágenes (4)y a la plataforma (7) para proveer de movimiento axial vertical del dispositivo de captura de imágenes (4) respecto a la cámara de Neubauer (5) de acuerdo a una instrucción de la unidad de cómputo (11);

donde la unidad de cómputo (11) está configurada para ejecutar los pasos de los métodos de las Reivindicaciones 1 a 9.

Número de Patente (11): NC2021/0015193

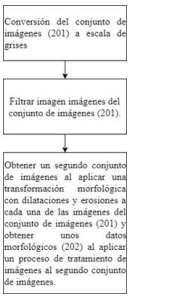
Estado de la solicitud: Bajo Examen de Fondo
Tipo de solicitud: NC Solicitud de Patente/Modelo/Trazado
Área Tecnológica: Instrumentos

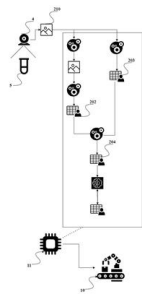
Fecha de radicación: 11 nov. 2021
Fecha de presentación (22): 11 nov. 2021
Fecha de aceptación: 11 may. 2022
Tiempo para la publicación: 6

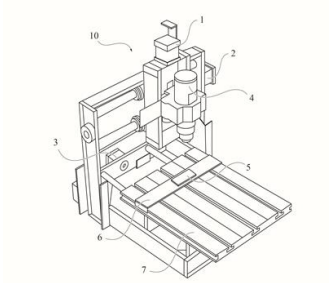
Fecha de publicación: 20 may. 2022
Fecha de Patente OPI: 11 may. 2022

Título: MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA DETERMINAR TÍTULOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VIRUS
Tipo: Patente de Invención Nacional

Resumen:







International Patent Classification (51): G01N 21/00, G01N 21/03, G01N 21/62, G01N 21/64, B01L 3/00, B01L 9/00, G02B 21/00, G01N 15/14, G01N 33/49, G06F 15/18, G06F 19/00, G06K 9/00, G01N 1/31, G01N 33/48, G09G 5/02

Inventor(es):

Felix Giovanni DELGADO TIRIA
Jonathan AVENDAÑO PEREZ
Andrés Felipe FARFÁN PINILLA
Geraldine ARDILA PATIÑO

Apoderado:

JUAN CARLOS SUAREZ DELGADILLO	Dirección Física : Calle 86 # 69H - 35 Casa 35, BOGOTÁ, D.C., CO Correo electrónico: juanc.suarez.d@gmail.com

Solicitante(s):

UNIVERSIDAD EL BOSQUE	DerechoDirección Física : CRA. 7B BIS NO. 132-11, BOGOTÁ, D.C., CO

Datos de contacto: JUAN CARLOS SUAREZ DELGADILLO, Calle 86 # 69H - 35 Casa 35, BOGOTÁ, D.C., CO

Historial:

Tipo	Descripción	Gaceta	Publicado
Pago de examen de patentablidad	Se ha pagado el examen de patentabilidad		26 ago. 2022
Cambio automático de apoderado/ representante legal	La solicitud de cambio de apoderado ha sido radicada y automáticamente inscrita.		22 jul. 2022
Solicitud de Patente publicada	La solicitud ha sido publicada	962	20 may. 2022
Examen de forma. Publica	Se aprobó el examen de forma.		19 nov. 2021
Entrada solicitud de patente. Ingresa	Ha ingresado solicitud de patente		12 nov. 2021

Solicitudes vinculadas:

Número de solicitud	Tipo de solicitud	Título de la solicitud	Fecha de radicación	Estado de la solicitud	Bajo oposición	Tipo de enlace
NC2022/0010295	NC Cambio de apoderado de Patente/ Modelo/Trazado	Solicitado en Patente NC2021/0015193	21 jul. 2022	Inscrita	N/A	Vinculado

Esta funcionalidad de búsqueda provee información desde los registros de Propiedad Intelectual gestionada por SIC. Aunque SIC tome el máximo cuidado posible en la provisión de estos servicios, SIC no asume ninguna responsabilidad por cualquier acción realizada con respecto a estos contenidos o sus posibles errores, inexactitudes, deficiencias, defectos u omisiones. Este sitio no pretende ser una fuente exhaustiva o completa de información de Propiedad Intelectual. Para obtener más orientación y asistencia en el uso de este sitio Internet, contáctenos por favor.