

Avances en Microscopía.

Desde la automatización en la
adquisición de la imagen al
procesado con inteligencia artificial



Índice

- Introducción Grupo VISILAB
- Introducción a la Microscopía
- Hardware en Microscopía
- Software: Procesado de imagen, AI
- Resultados: Aplicaciones Microscopía
- Conclusiones - Futuras líneas

Introducción

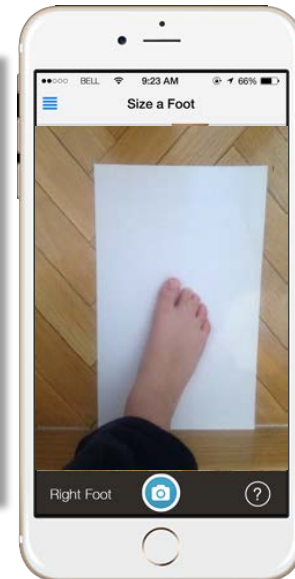
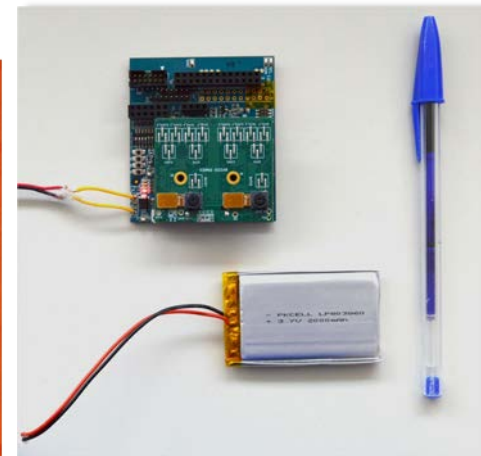
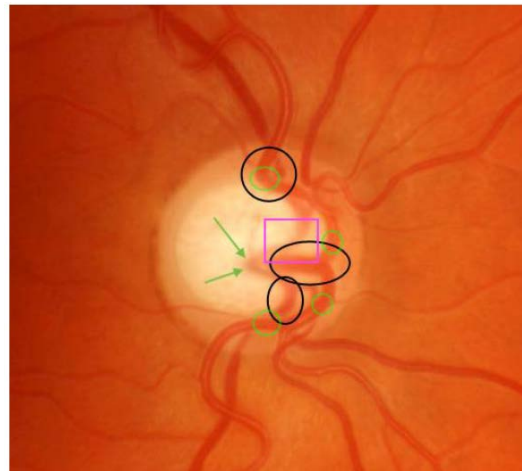
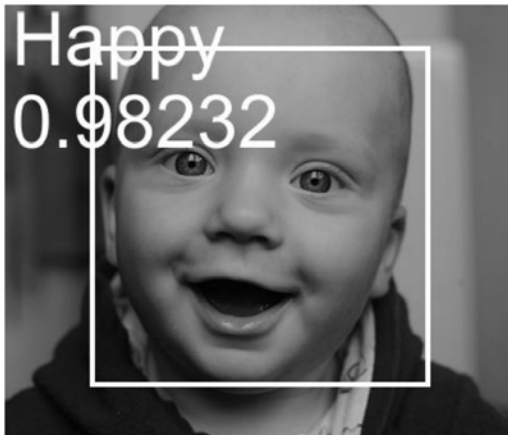
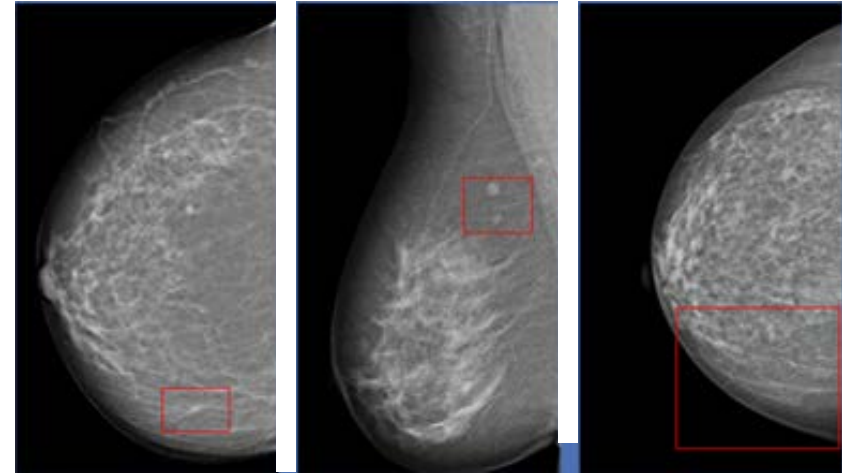


ETSII y ESI de la UCLM en Ciudad Real:

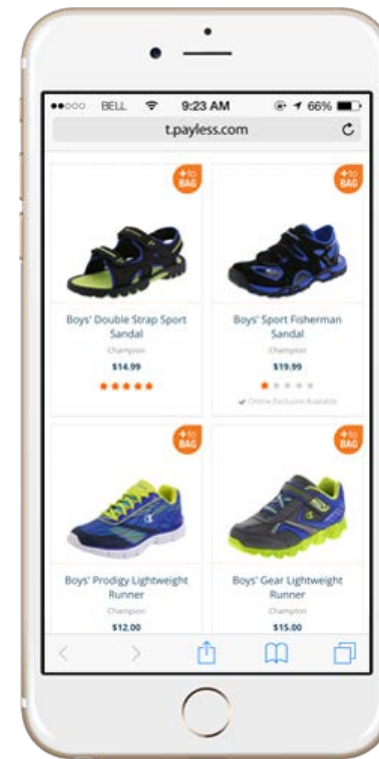
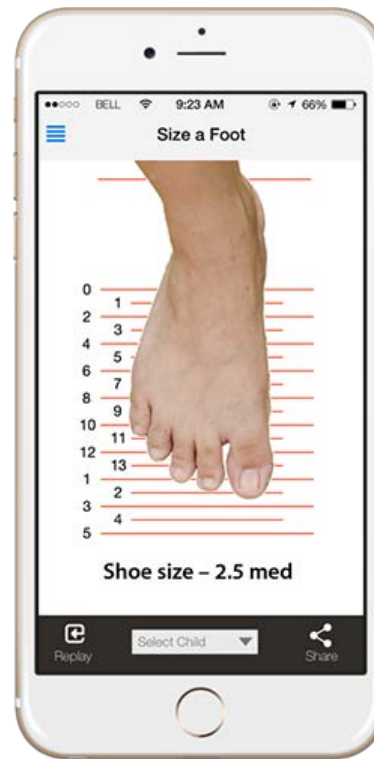
- Visión por Computador
- Inteligencia Artificial

Desde el 2004

- Proyectos de Investigación
- Transferencias con la empresa
- Start-up UBOTICA finales del 2018

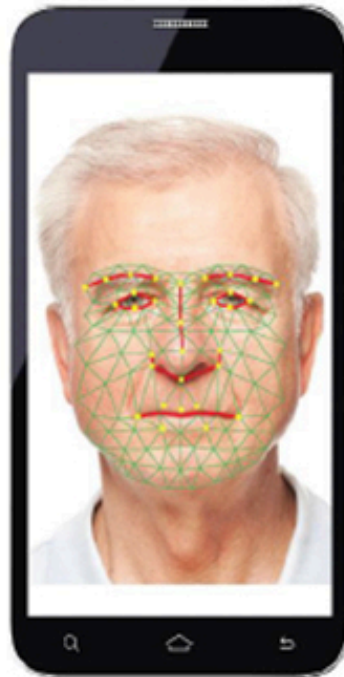


FootSizer App

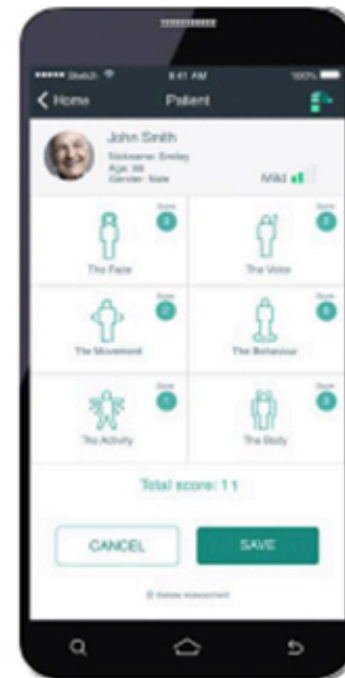


<http://footsizer.co>

Pain detection

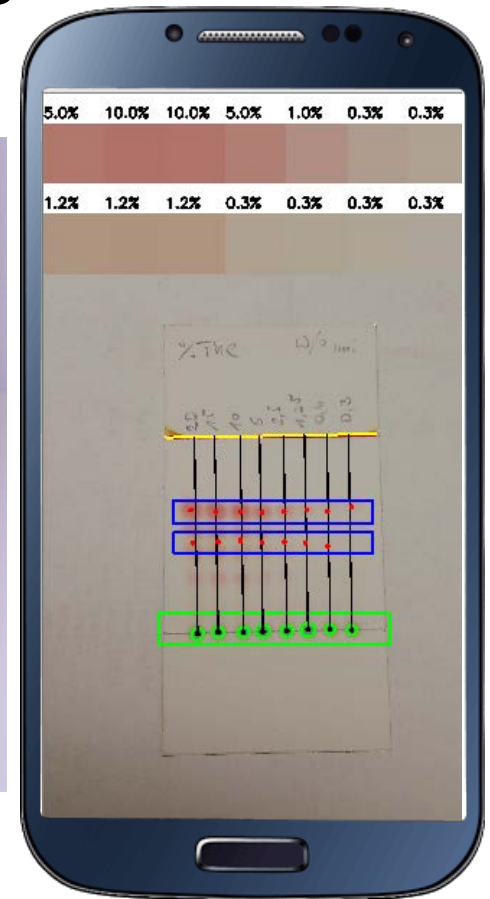
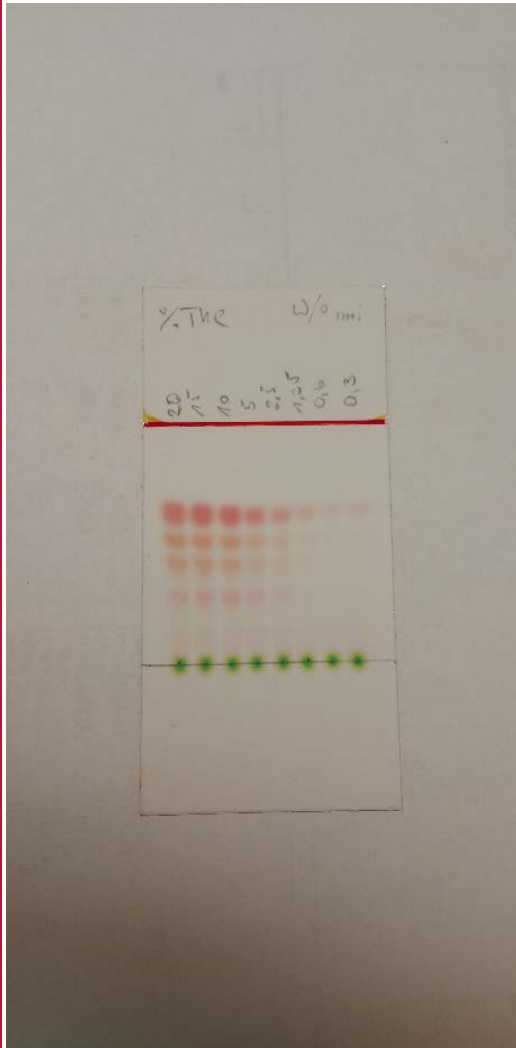


PainChek™ artificial intelligence assesses facial micro-expressions that are indicative of the presence of pain



PainChek™ six domains of pain assessment that calculates pain severity score

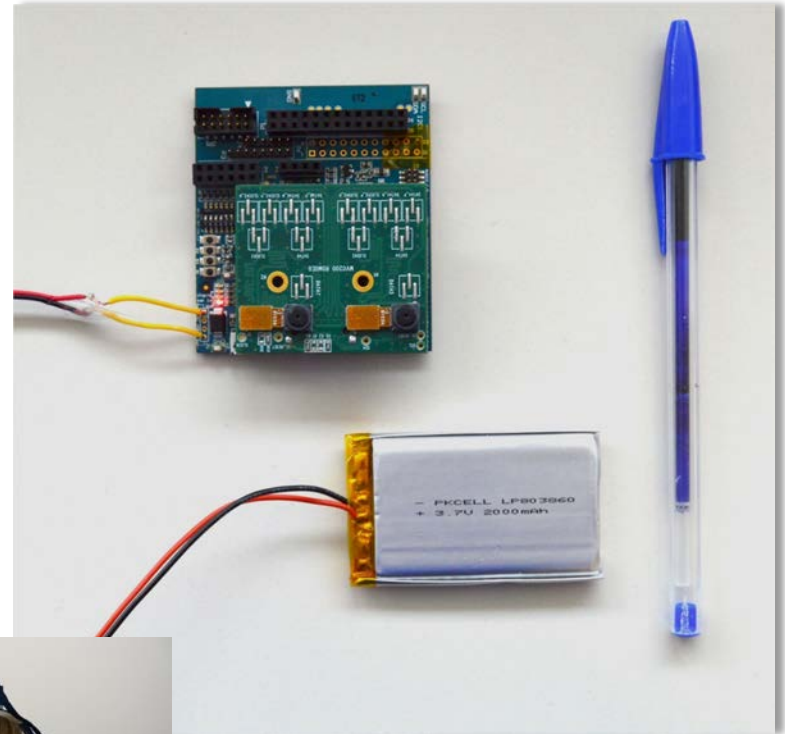
Cannabis levels App





H2020, 8 partners
Coordinated by VISILAB

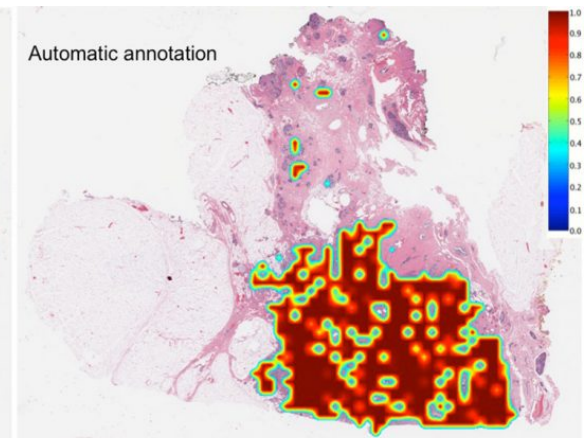
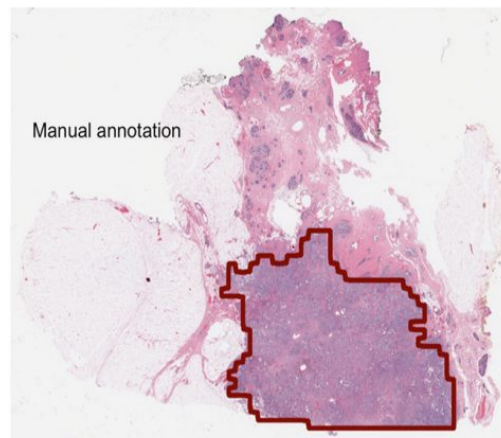
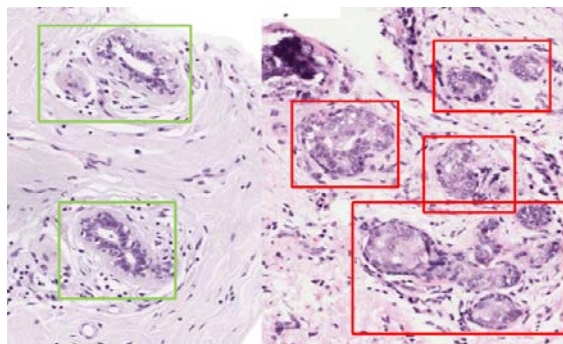
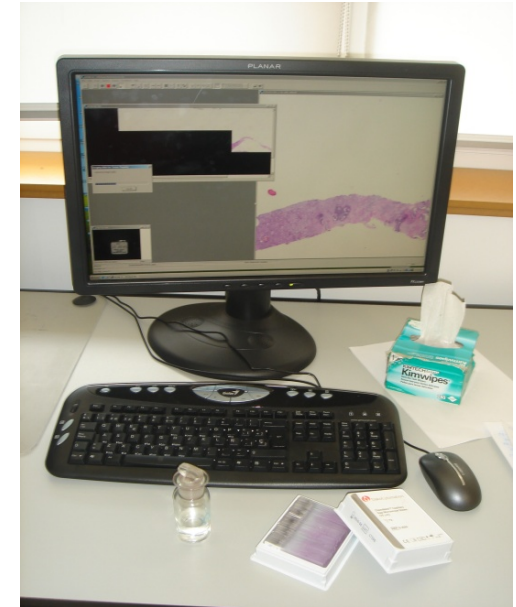
Embedded vision and Deep Learning







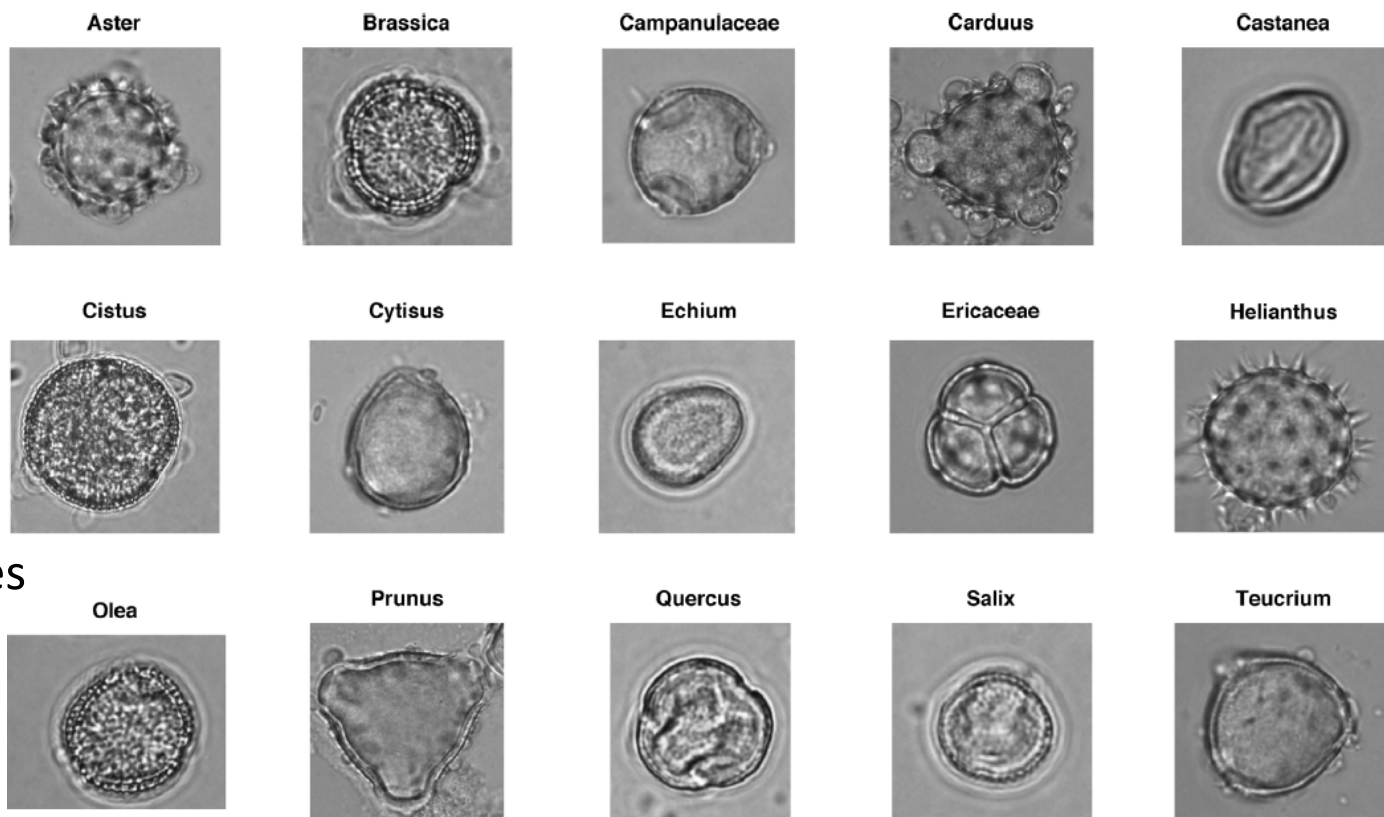
H2020, 11 partners
Coordinated by VISILAB



APIFRESH: Developing European standards for bee pollen and royal jelly: quality, safety and authenticity.

Identificación Automática

15 especies diferentes

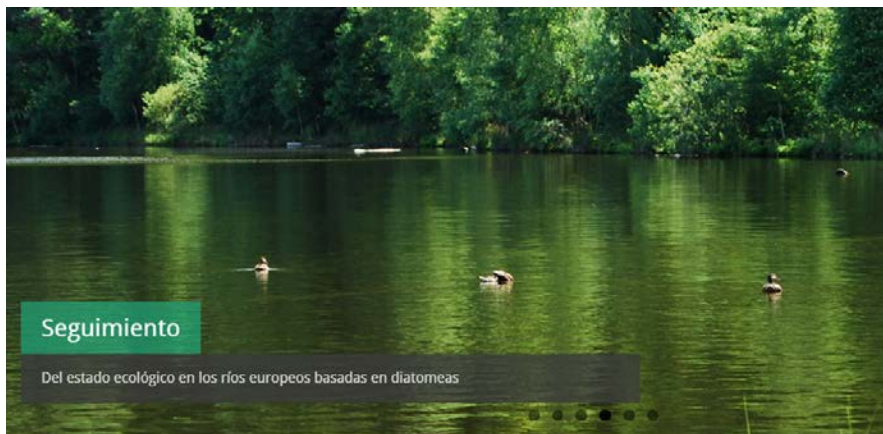
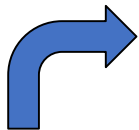




AQUALITAS
IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN
AUTOMÁTICA DE DIATOMEAS

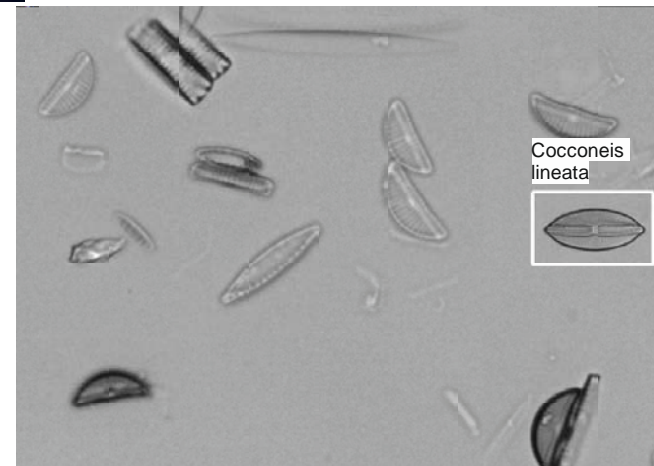
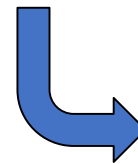
Identificación Automática

100 especies de diatomeas diferentes

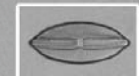


Seguimiento

Del estado ecológico en los ríos europeos basadas en diatomeas



Cocconeis lineata



Introducción

Microscopía

Hardware

Software

Resultados

Conclusiones

Microscopía

- La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeño tamaño están fuera del rango de resolución del ojo humano.
- El origen y desarrollo del microscopio precipitó múltiples ramas de la ciencia, en especial la microbiología. El estudio de los microorganismos ha permitido al ser humano ser consciente del mundo microscópico que le rodea y comprender el funcionamiento de gran parte de los procesos biológicos.
- Además, si a estos microscopios se les dota de los avances de la ingeniería y las tecnologías de la información su consecuencia es la evolución a pasos agigantados de campos como la medicina y la biología, con los beneficios implícitos que supone para el ser humano.

Introducción

Micr



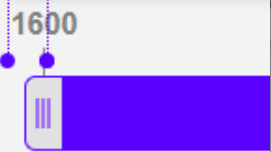
JAN 1, 1937
Ruska y knoll

construyen el primer microscopio electrónico el cual aumenta 1000 veces la magnificación del material observado y tiene una resolución 400 veces mejor.

Jan 1, 1600, Leeuwenhoe

Jan 1, 1600, (1564-1642)

Jan 1, 1590, Jan Zacharias Janss

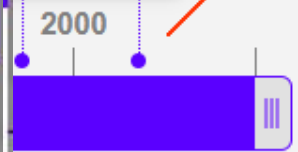


hming

937, Ruska y

0, Lebedeff

2005



Años 2000 -2005

- Microscopios robotizados
- Escáneres de microscopía

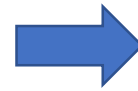
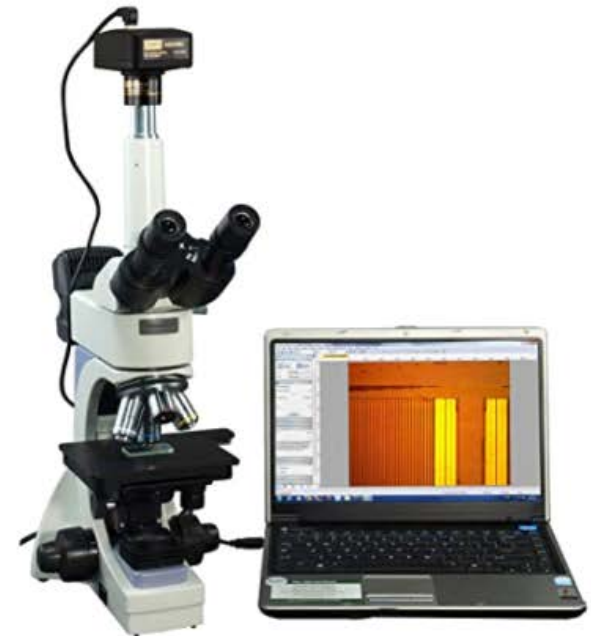
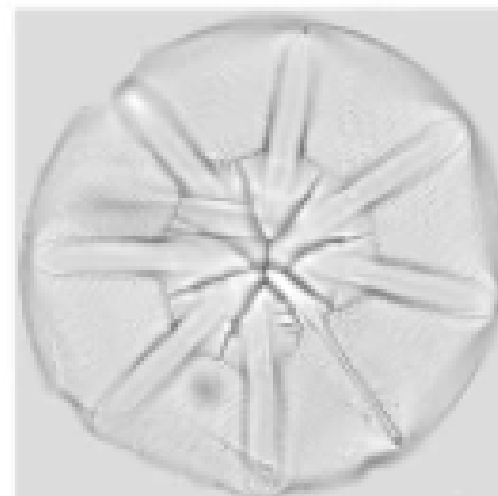
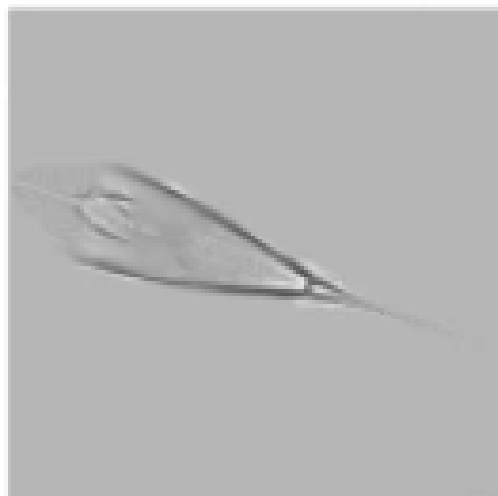
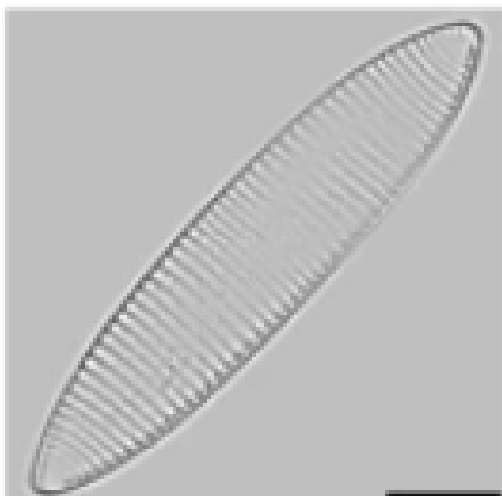
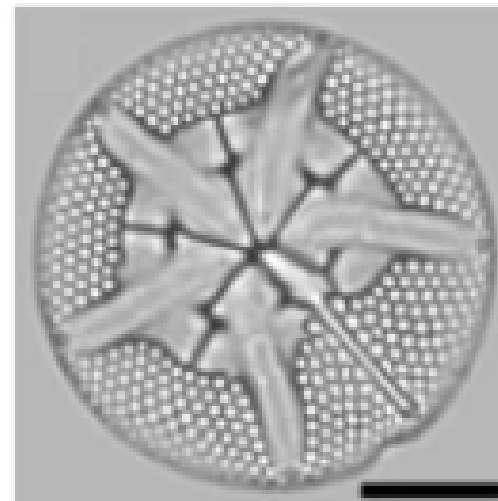
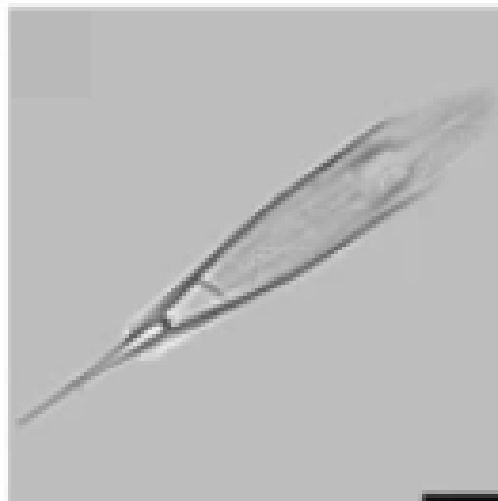
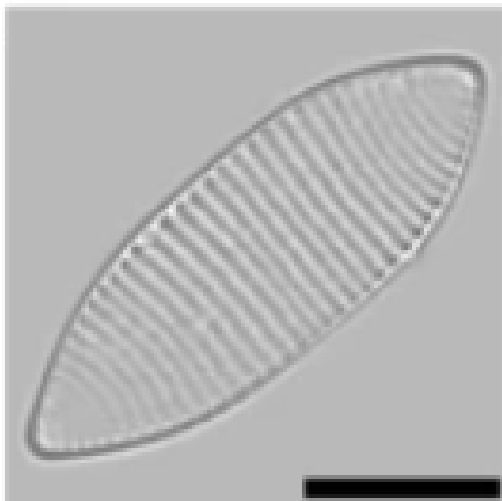


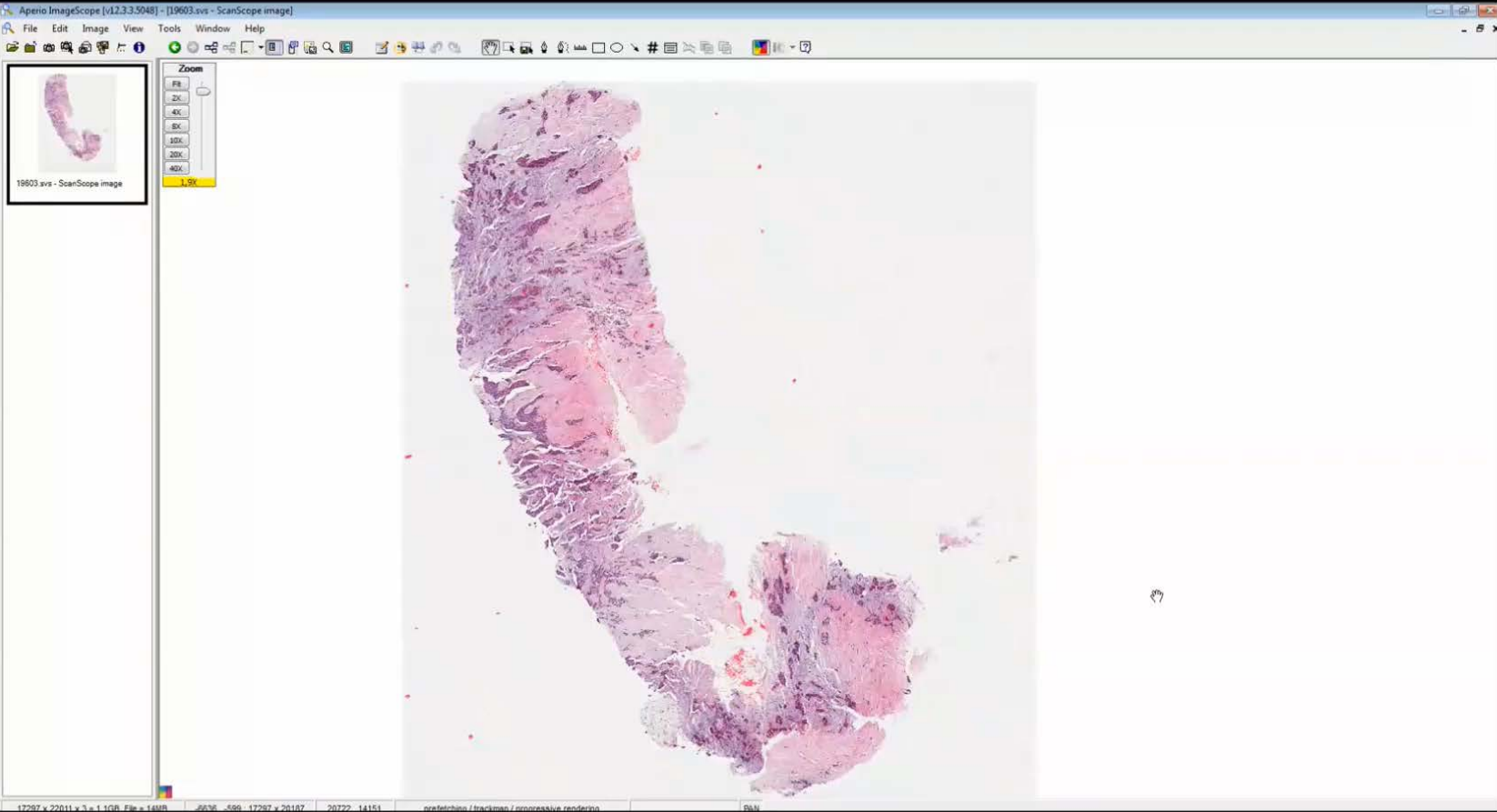
Imagen digital



Virtual slides







MARÍA GLORIA BUENO GARCÍA

La imagen digital en microscopía es especialmente útil:

- Biología
- Medicina
- Educación

Problema:

- Sistemas comerciales caros
 - **30.000€ - 150.000€**



Introducción

Microscopía

Hardware

Software

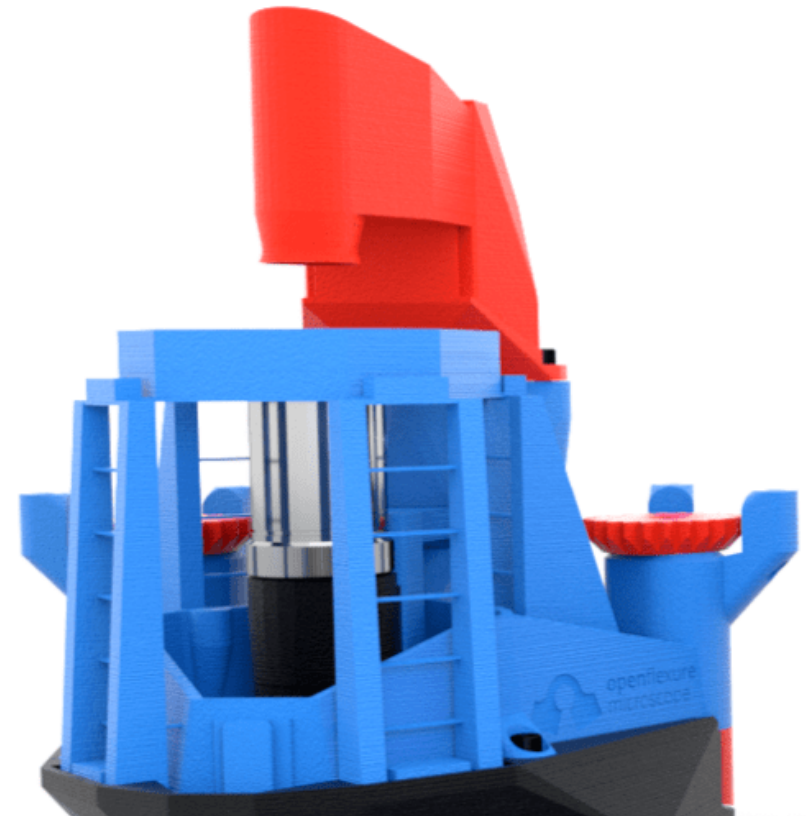
Resultados

Conclusiones

Hardware

Proyectos Ciencia Abierta/DIY:

- OpenFlexure
- Incubot 3D



OpenFlexure



*applied
sciences*



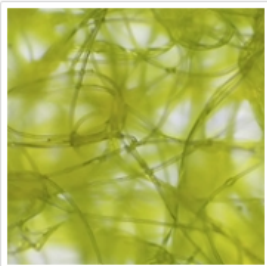
Article

A Low-Cost Automated Digital Microscopy Platform for Automatic Identification of Diatoms

Jesús Salido ^{1,*}, Carlos Sánchez ², Jesús Ruiz-Santaquiteria ¹, Gabriel Cristóbal ²,
Saul Blanco ³ and Gloria Bueno ¹

Received: 28 July 2020; Accepted: 25 August 2020; Published: 31 August 2020

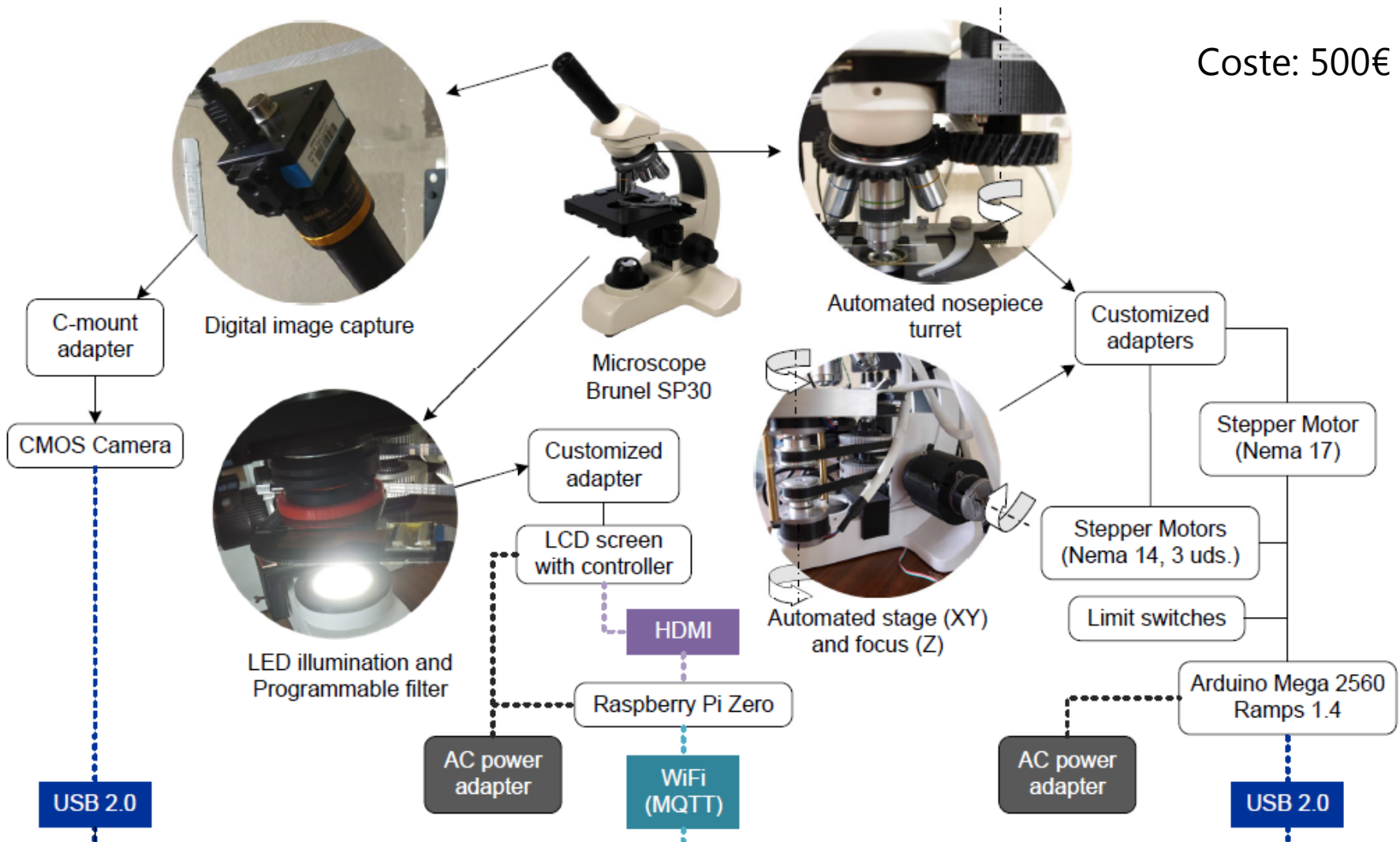
Biomedical Optics Express Vol. 12, Issue 11, pp. 7223-7243 (2021) • <https://doi.org/10.1364/BOE.439014>



MicroHikari3D: an automated DIY digital microscopy platform with deep learning capabilities

J. Salido, P. T. Toledano, N. Vallez, O. Deniz, J. Ruiz-Santaquiteria, G. Cristobal, and G. Bueno

Coste: 500€



Introducción

Microscopía

Hardware

Software

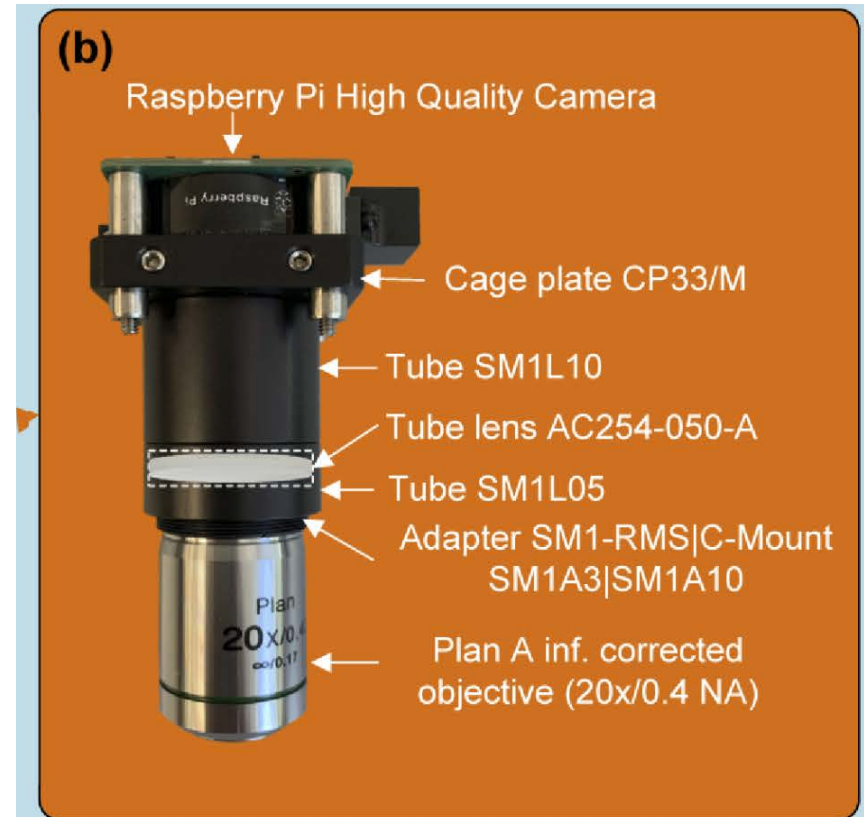
Resultados

Conclusiones





Tronxy X1 3D



Coste: 300€

Iluminación

Inferior

- Placas modulares de luz
 - Patrones de luz diferente
 - Luces de diferentes longitudes de onda
- Hueco para deslizar filtros

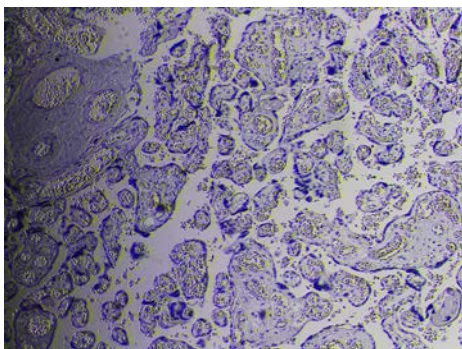
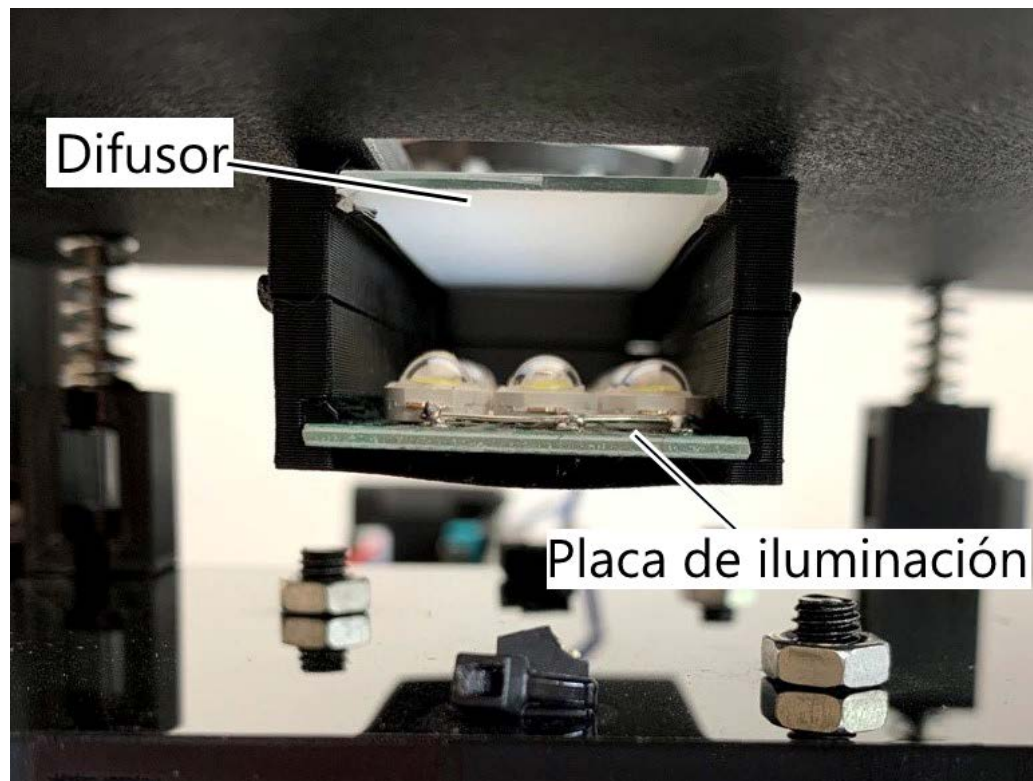


Imagen con sombras



Iluminación

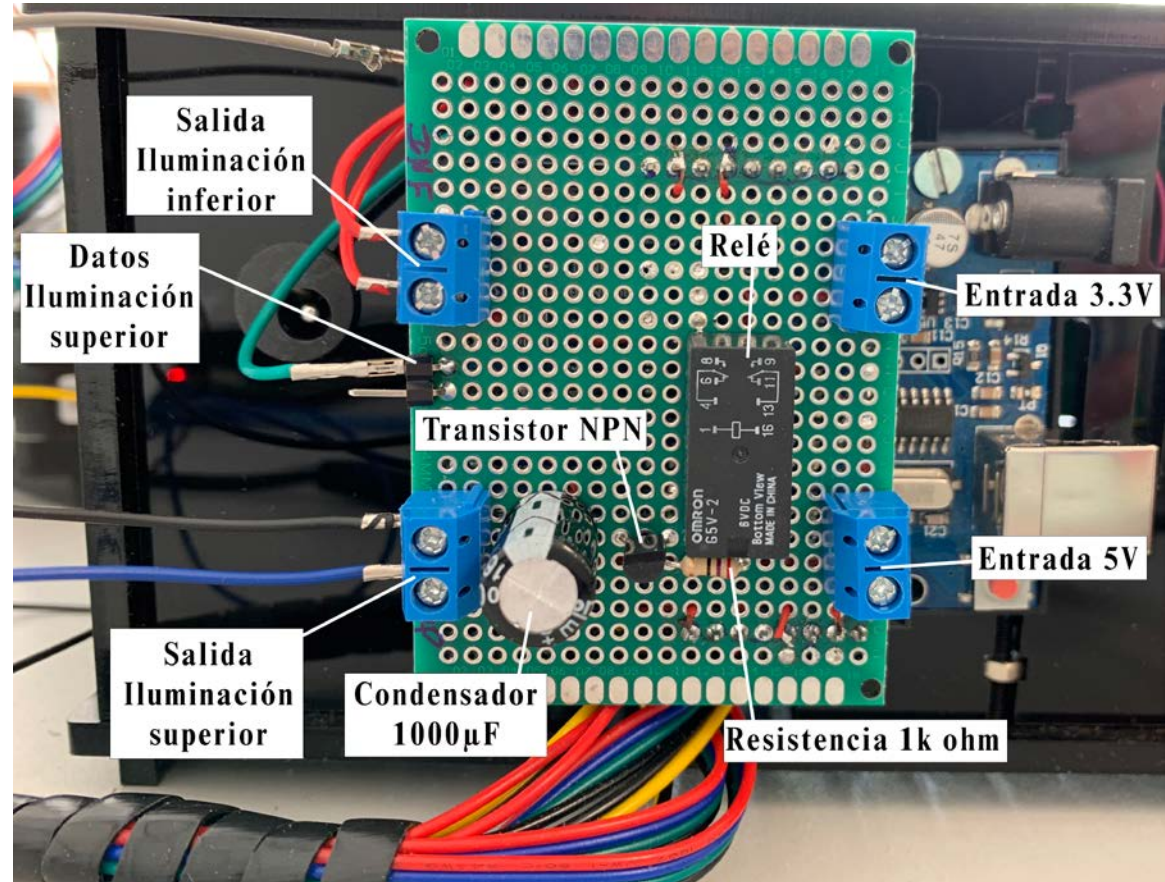
Superior

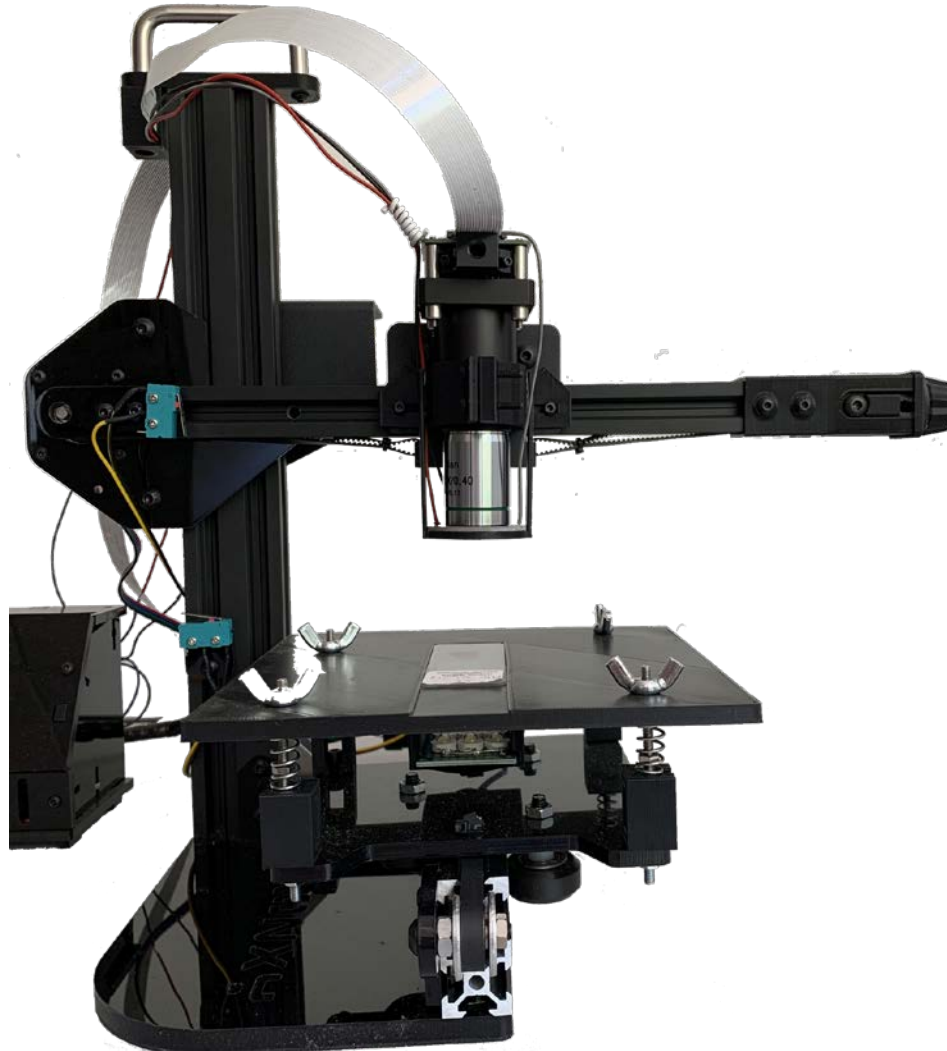
- Aro **RGBW** Neopixel
 - Permite elegir el color deseado
 - Parte blanca **4500K**

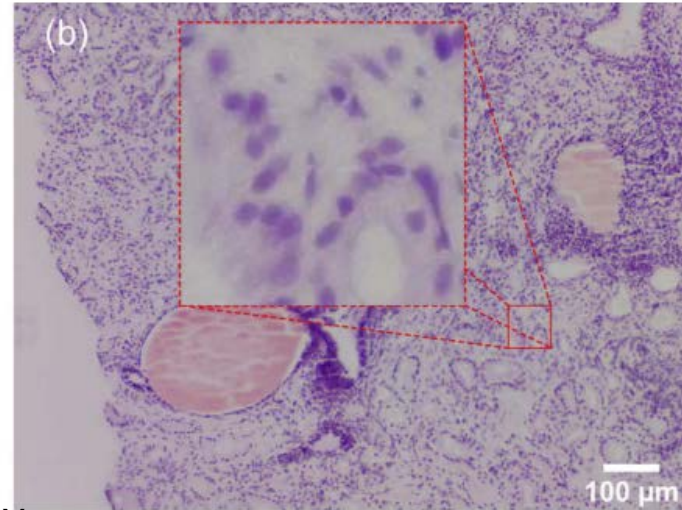
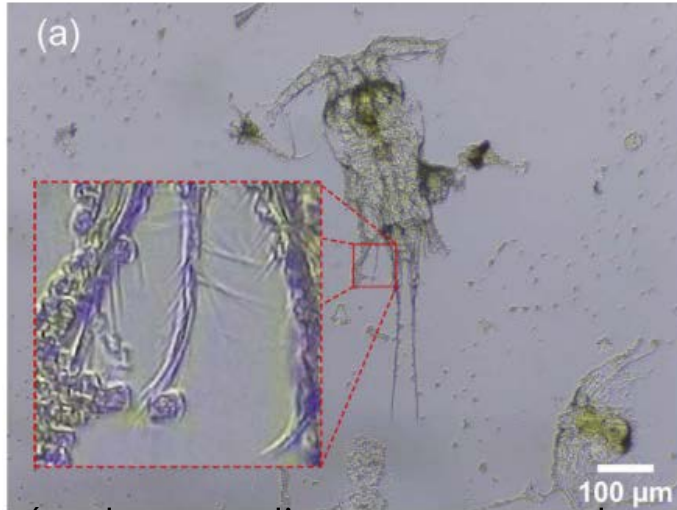


Iluminación

- Control electrónico gracias a un Arduino UNO
 - **Shield** de control
- Alimentación extraída de la impresora 3D

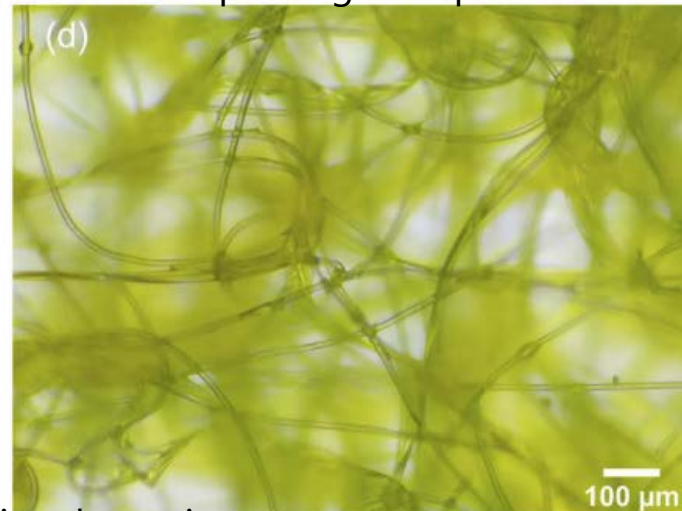
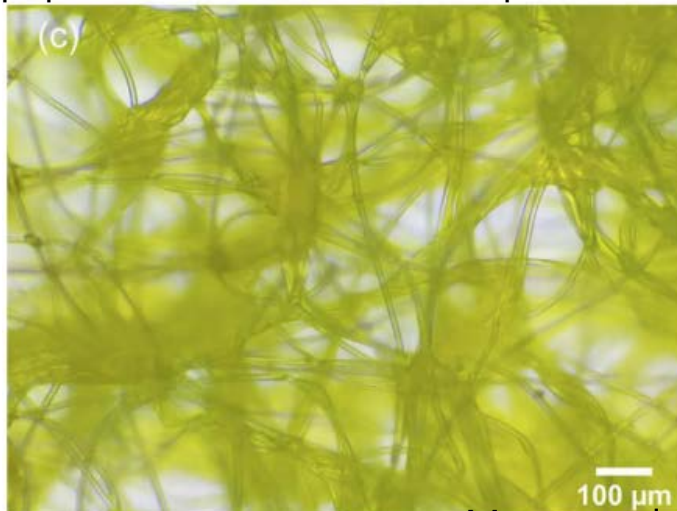






Copépedo en medio acuoso capturado a 10X

Muestra patológica capturada a 20x



Muestras de cianobacterias

Introducción

Microscopía

Hardware

Software

Resultados

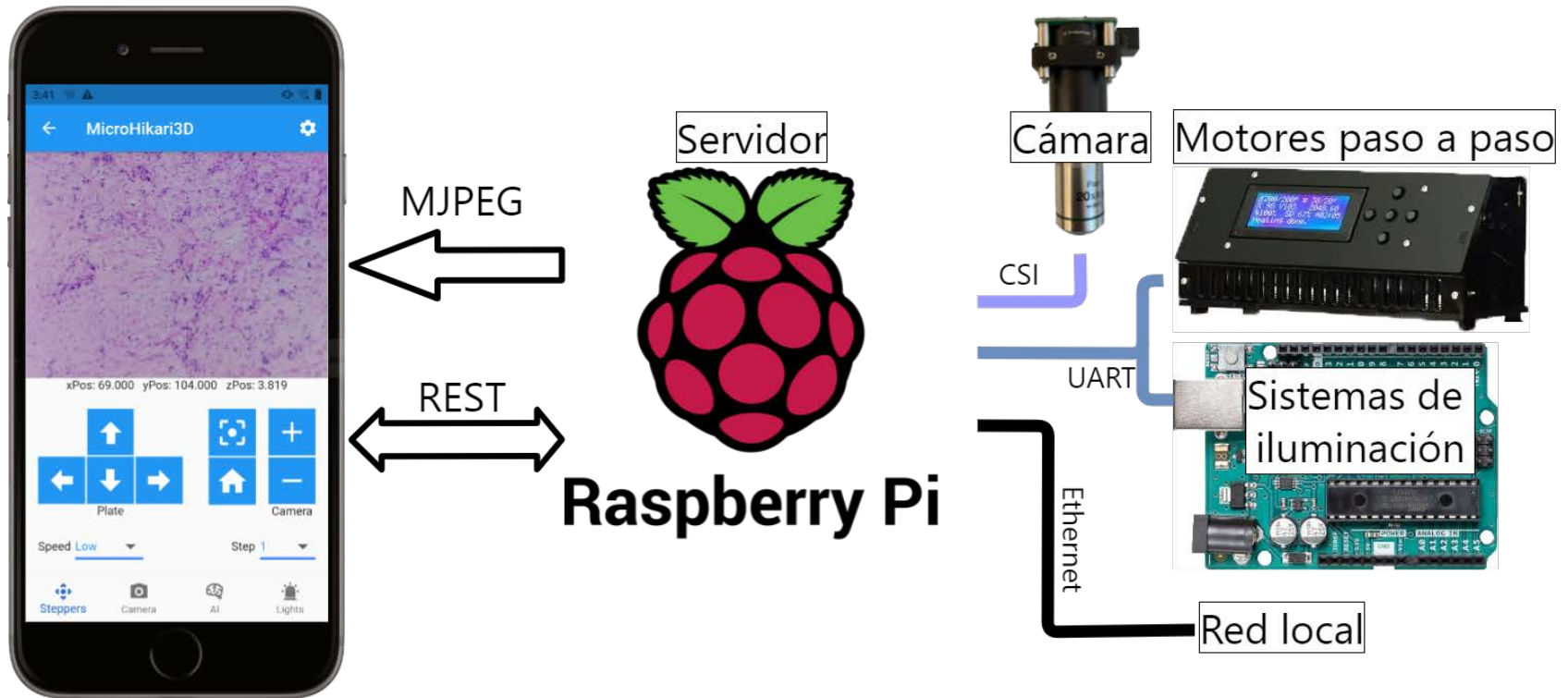
Conclusiones

Software

Desarrollo de software para:

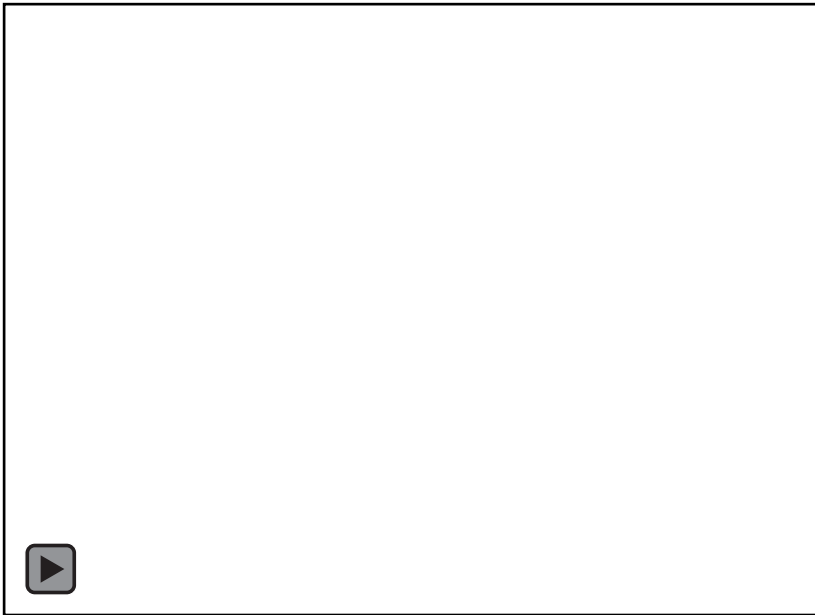
- a) Los sistemas de bajo coste con aplicaciones on-line
- b) El procesamiento de las imágenes WSI de los escáneres de microscopía, con aplicaciones of-line.

- Arquitectura cliente-servidor
 - Servidor: Raspberry Pi 4 B+
 - Cliente: App móvil, navegador, OBS, VLC, etc

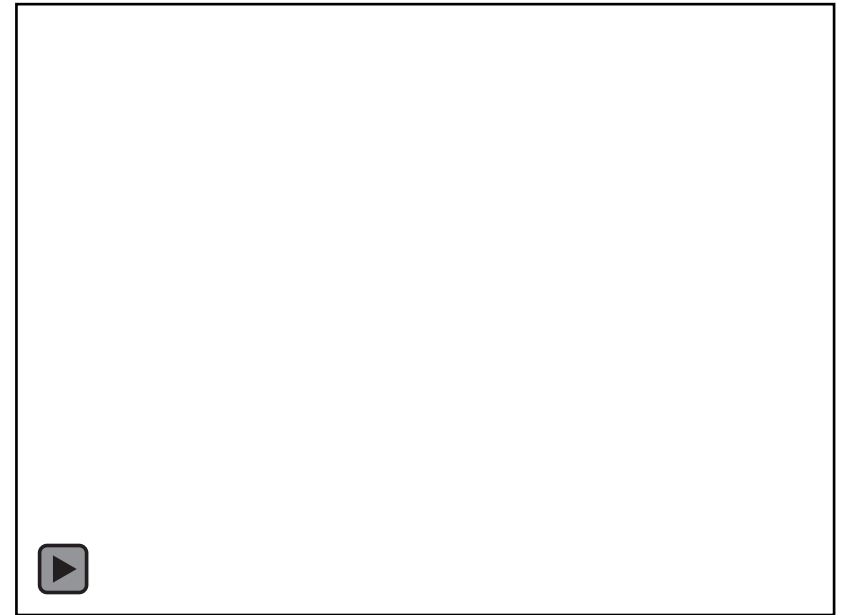


Enfoque automático

- Mueve el eje Z hasta alcanzar un máximo
- Métrica para el enfoque: Varianza del Laplaciano



Enfoque grueso



Enfoque fino

Introducción

Microscopía

Hardware

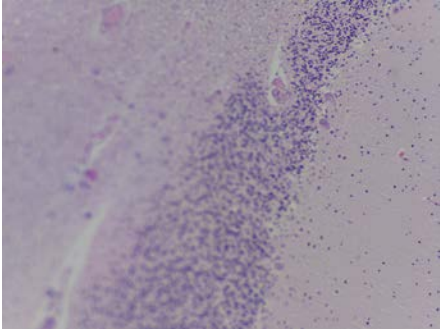
Software

Resultados

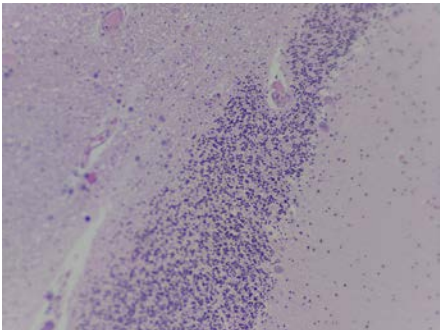
Conclusiones

Apilamiento de enfoque

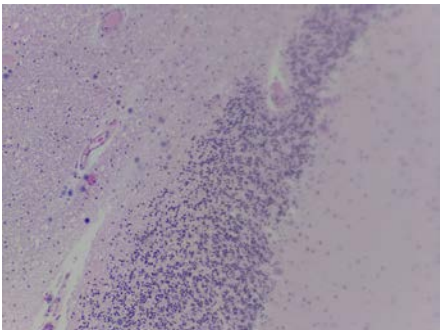
Eje Z +0.02 mm



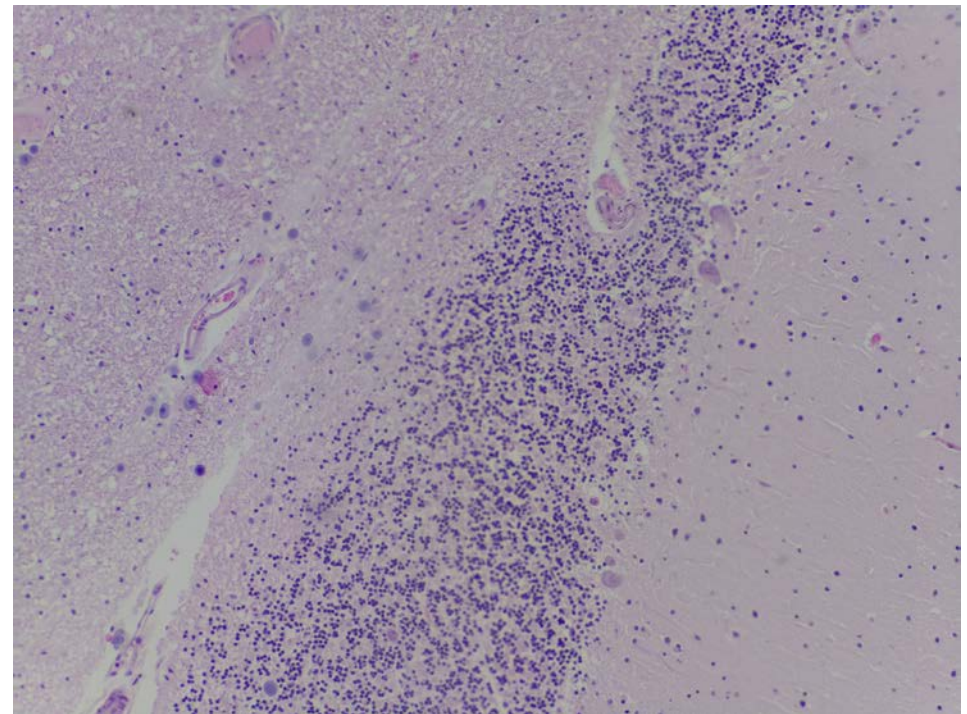
Eje Z 0 mm



Eje Z -0.02 mm



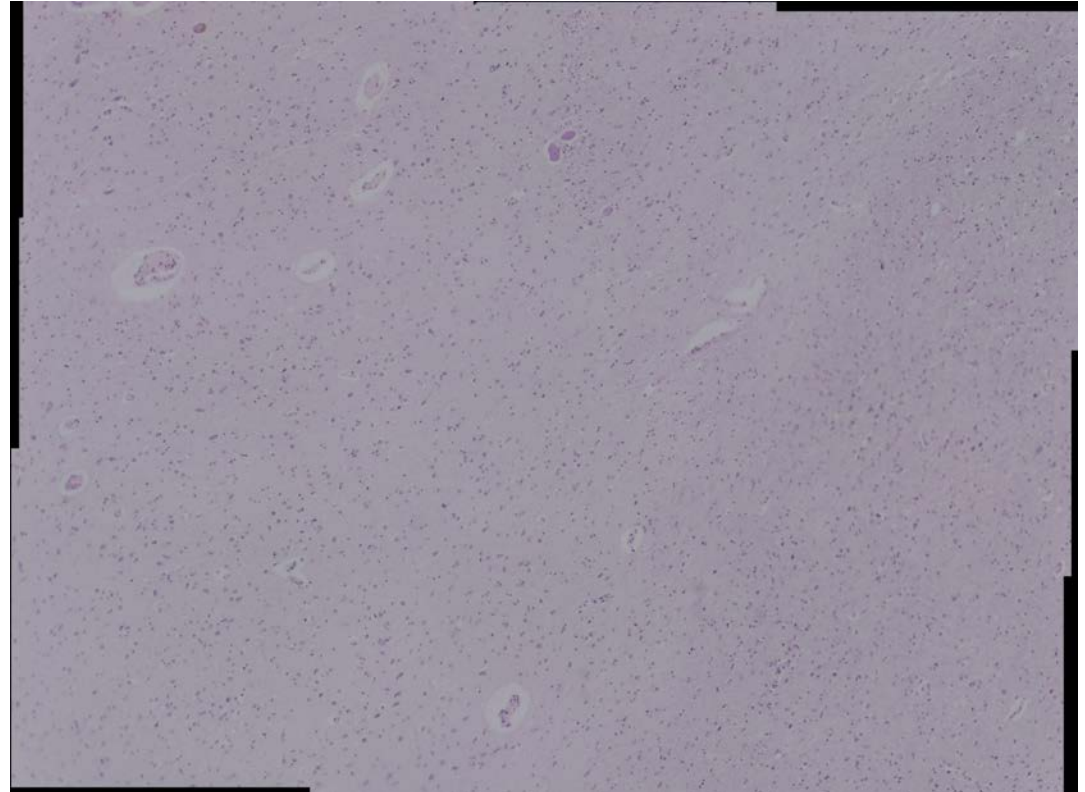
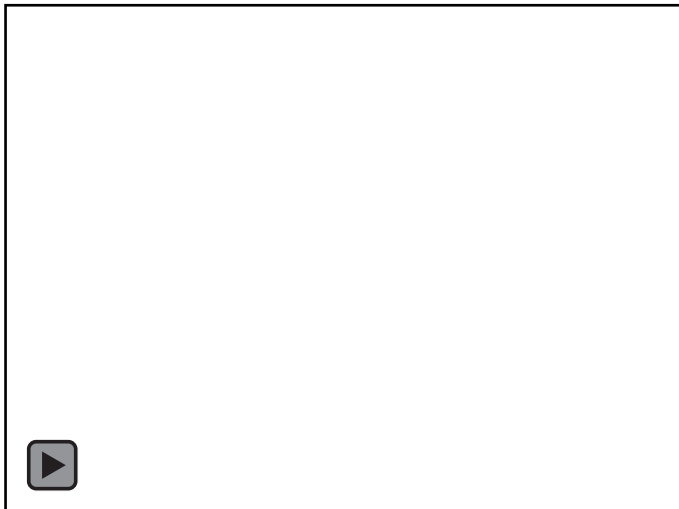
- No toda la muestra puede estar en un plano focal
- Base no nivelada



Resultado

Escaneo automático (Stitching)

- Ideal para muestras que ocupan más de un FoV
- Se puede incluir apilamiento de enfoque
- Dos patrones de movimiento:
 - En 2 (+ Rápido)
 - En Z (+ Preciso)



Resultado

App Flutter

- Kit de desarrollo de software de Google
- Permite crear apps multiplataforma
- Lenguaje de programación **Dart**
- No utiliza los elementos gráficos nativos de la plataforma



Flutter



Introducción

Microscopía

Hardware

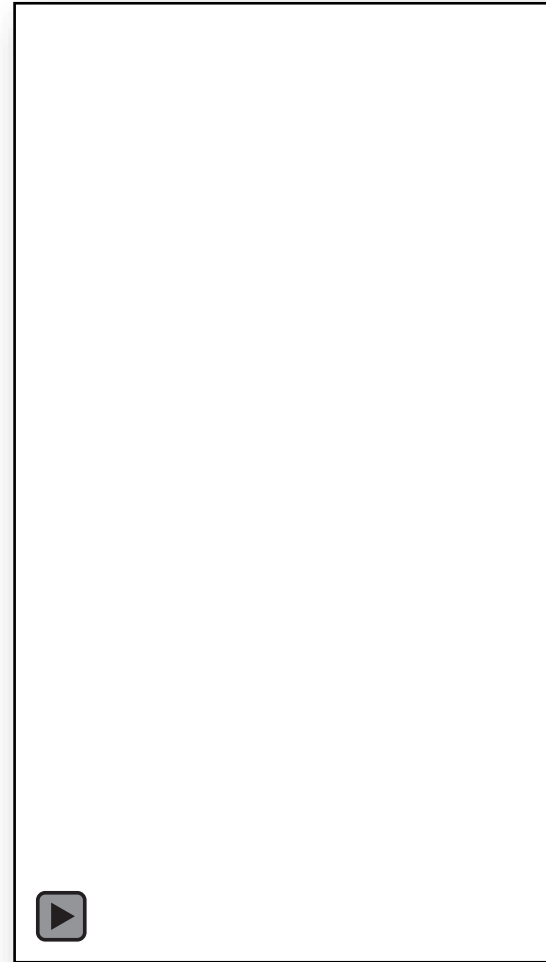
Software

Resultados

Conclusiones



Apilamiento de enfoque



Control de los motores paso a paso

Introducción

Microscopía

Hardware

Software

Resultados

Conclusiones



Control de los sistemas de iluminación

Clasificación de imágenes

Inferencia directamente en el microscopio del FoV

Modelos:

- Puros TensorFlow Lite
- Convertidos de TensorFlow

Especialmente útil para entornos médicos y biológicos:

- Clasificación de tejidos en maligno y benigno

Compatible con Coral USB

Redes neuronales probadas con éxito

Modelo	Precisión	Tiempo inferencia
MobileNetV2	0.91915%	128 ms
EfficientNet0 Lite	0.92137%	159ms
ResNet50	0.92469%	900ms
InceptionV3	0.92248%	1090ms



TensorFlow Lite

Introducción

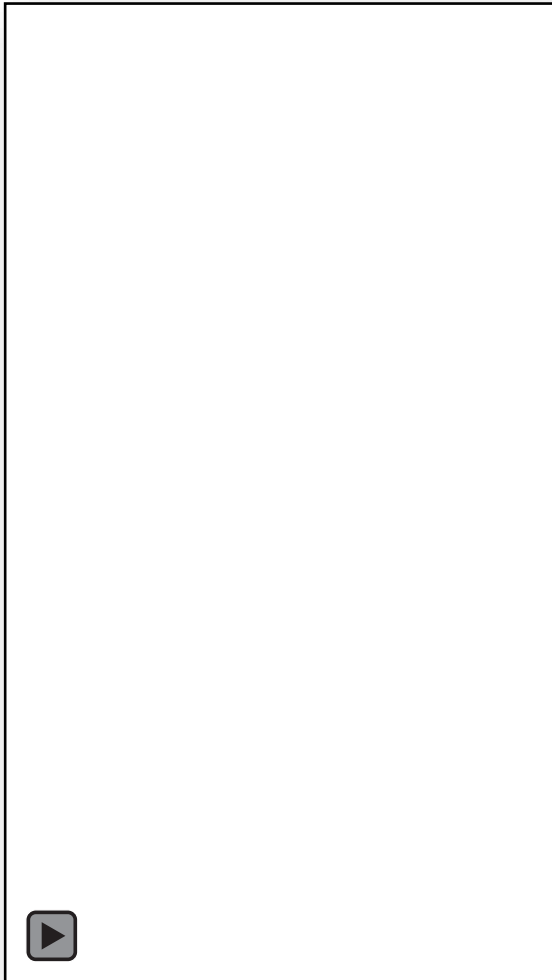
Microscopía

Hardware

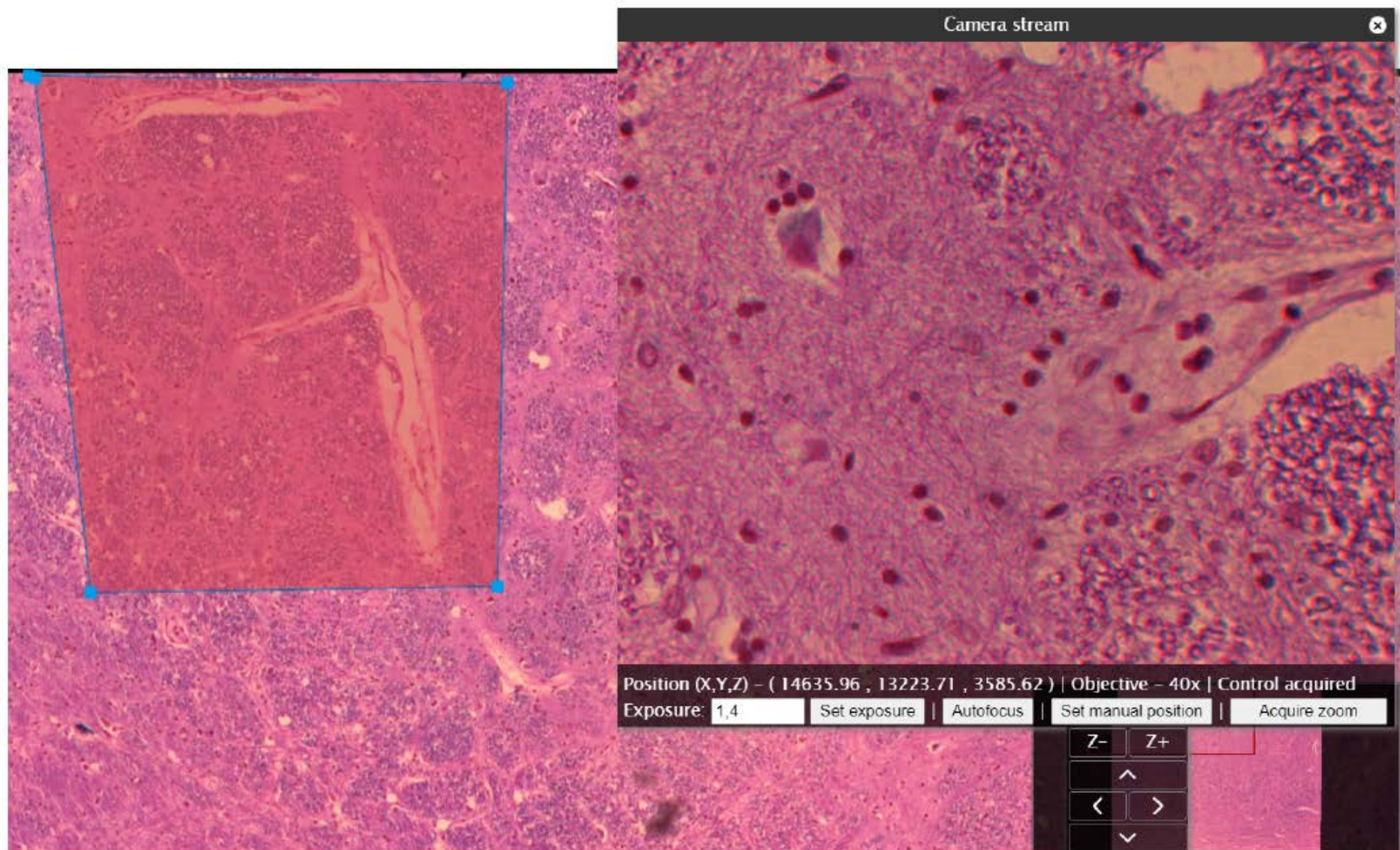
Software

Resultados

Conclusiones



Inferencia sobre la imagen



Ajustes del usuario en el proceso de zoom

Introducción

Microscopía

Hardware

Software

Resultados

Conclusiones

Resultados

Her2 Grading: Aplicación al Cáncer de Mama

Motivación: evaluar la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) mediante el examen visual de inmunohistoquímica (IHC) en el cáncer de mama invasivo (BCa) es una parte clave del diagnóstico evaluación de BCa por su reconocida importancia como marcador predictivo y pronóstico en la práctica clínica.

Sin embargo, la puntuación visual de HER2 es subjetiva y, en consecuencia, propensa a la variabilidad entre observadores. Dadas las implicaciones pronósticas y terapéuticas de la puntuación HER2, se requiere un método más objetivo.

Herramienta desarrollada: una herramienta capaz de proporcionar una calificación Her2 global de 0 a 3 de una imagen de diapositiva completa. Además, la herramienta es capaz de visualizar los resultados por área si es necesario o requerido.

Introducción

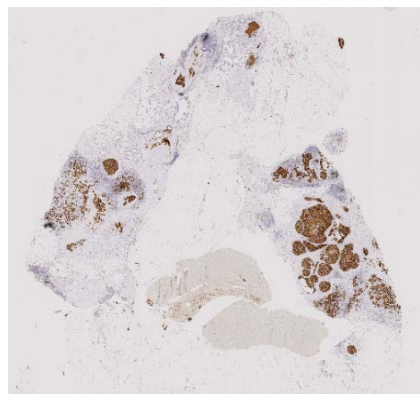
Microscopía

Hardware

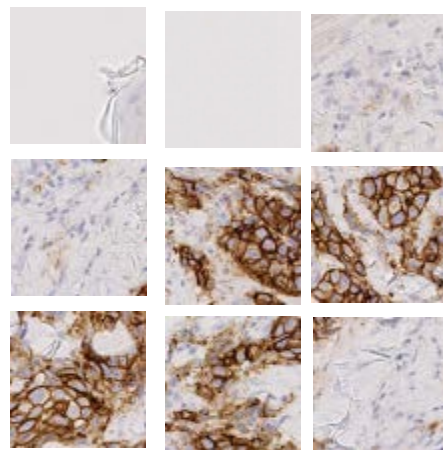
Software

Resultados

Conclusiones



Whole Slide Images (WSI)



68x68 patches

24,000 manually labelled patches



480,000 data augmentation patches

75%

25%

360,000 for training

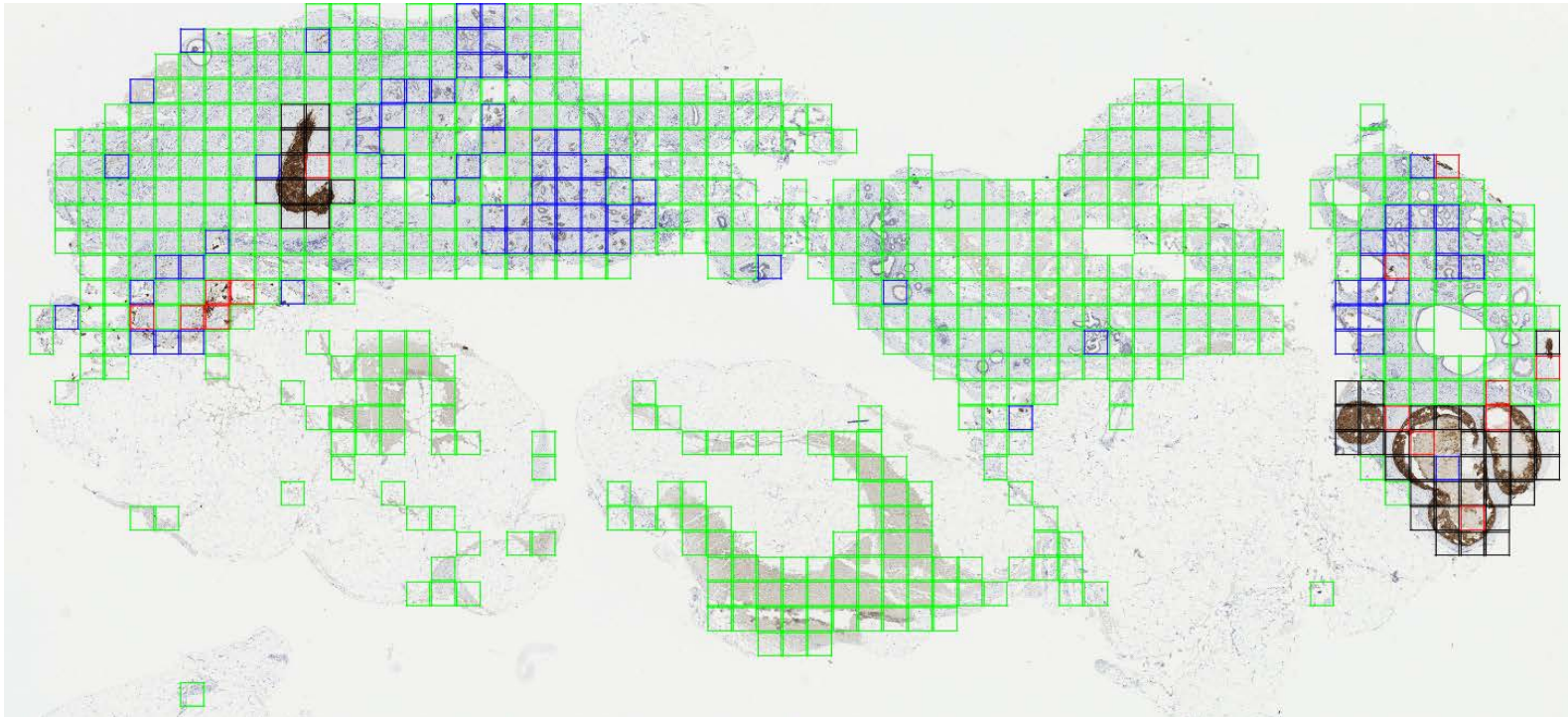
120,000 for validation



Score Global: 3



Score Global: 3



Artículo publicado: lectura adicional. Este trabajo ha sido publicado en:

- 'HER2 challenge contest: a detailed assessment of automated HER2 scoring algorithms in whole slide images of breast cancer tissues'

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.13333>

Segmentación de Vasos Sanguíneos: Aplicación a la Angiogenesis

Motivación: tumor growth and metastasis are angiogenesis and lymphangiogenesis dependent providing novel therapeutic targets in malignant disease. A common feature of tumor vessels studies is the focus on microvessel density overlooking other parameters that might be significant, such as the size and shape of the microvessels. In many aspects, tumor vessels are different from normal vessels. Studies have revealed the importance of the size and shape of blood vessels in, for example, laryngeal tumors.

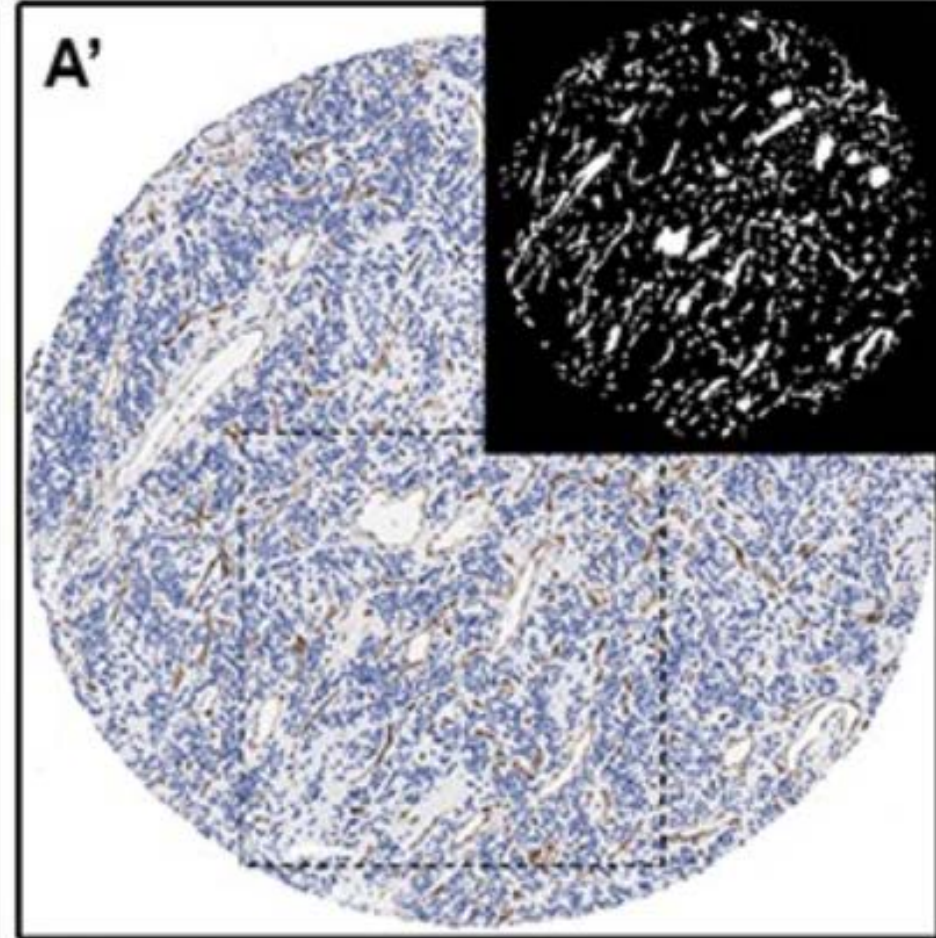
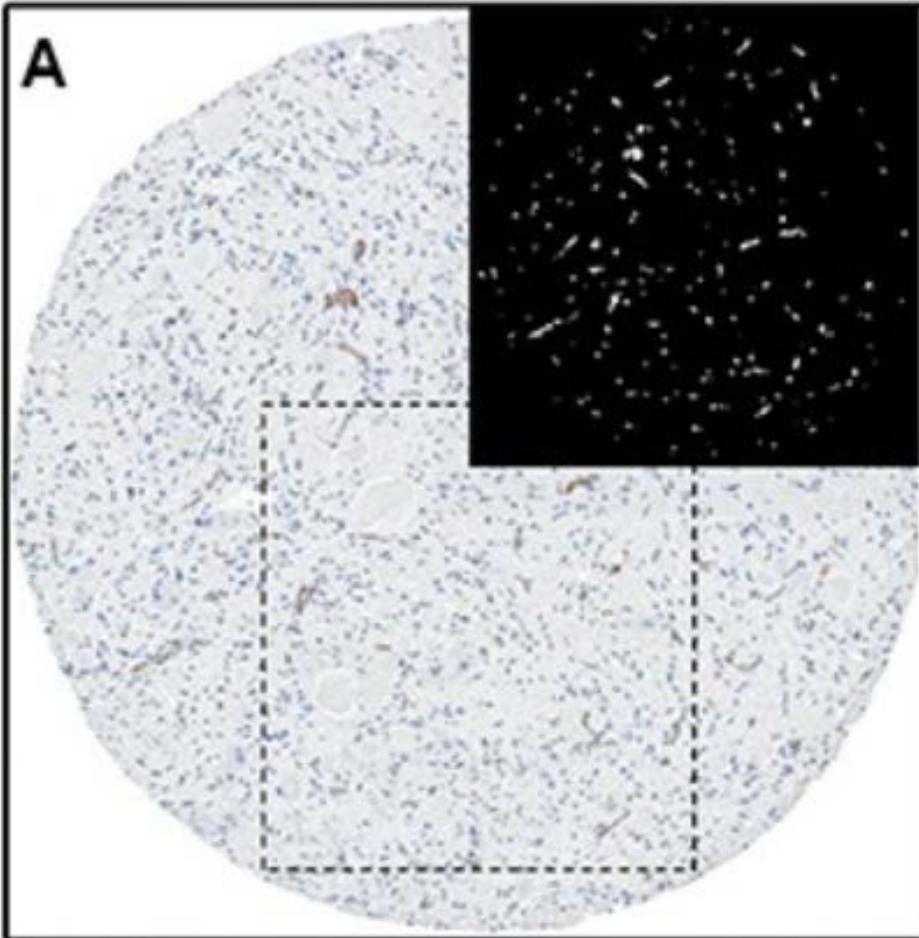
Herramienta desarrollada: a morphometric tool able to perform a segmentation of blood and lymphatic vessels to study vascularization following the hypothesis that tumor prognosis may not only be influenced by microvascular density but also by the shape and size of the vessels.

Area	Width	Height	Angle	Roundness	Aspect	Perimeter ratio	Perimeter	Deformity	Shape	Vertices
------	-------	--------	-------	-----------	--------	-----------------	-----------	-----------	-------	----------

The tool is able to automatically detect all vessels, close them is needed and quantify a set of 11 morphometric features:

CLINICAL AND BIOLOGICAL VARIABLES OF GOOD PROGNOSIS

CLINICAL AND BIOLOGICAL VARIABLES OF POOR PROGNOSIS



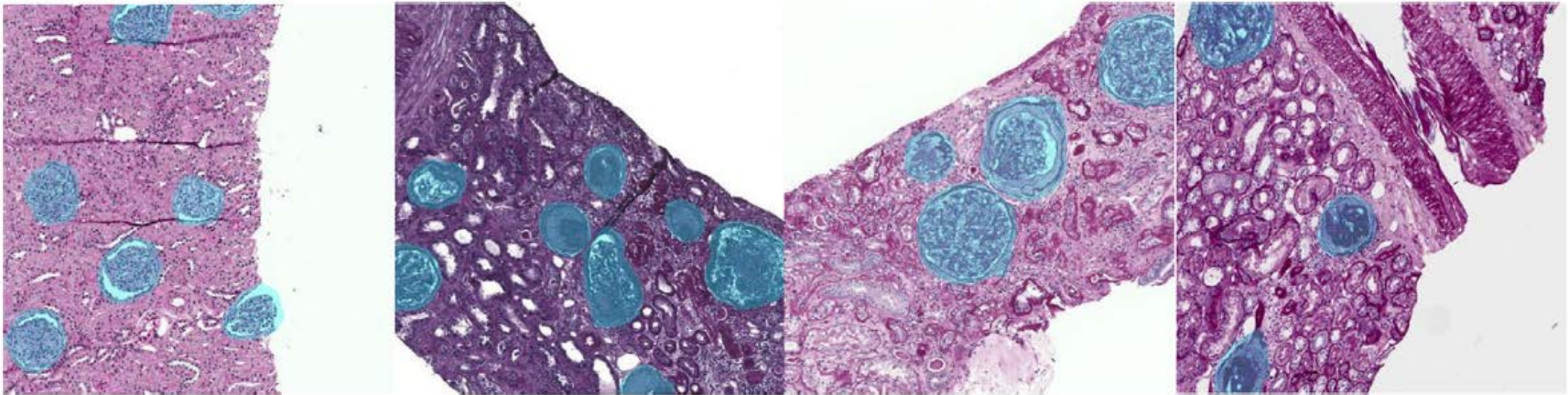
Glomeruli Detection: Aplicación a enfermedades de riñón

Motivación: La identificación de glomérulos, es decir, la detección y caracterización, es un procedimiento clave en muchos estudios de nefropatología. Teniendo en cuenta las alteraciones morfológicas, la lesión glomerular presenta la denominada glomérulo-esclerosis, que se caracteriza por presentar el glomérulo con diferentes grados de esclerosis.

En la práctica diaria, cada biopsia renal debe someterse a una cuantificación del número total de glomérulos encontrados en cada corte. Se realizan alrededor de 20 a 30 cortes por biopsia renal. Además, es necesario indicar aquellos glomérulos que se encuentran globalmente esclerosados. Esto debe reflejarse en cada informe de patología ya que el número de glomérulos evaluados debe ser lo suficientemente representativo para hacer un diagnóstico.

Herramienta desarrollada: Una herramienta capaz de: (a) realizar una detección glomerular y (b) clasificar automáticamente entre glomérulos normales y esclerosados. Los algoritmos se han aplicado a imágenes de diapositivas completas.

Results - Example:



Segmentation results obtained from the SegNet-VGG19 where glomerular structures are highlighted in cyan.

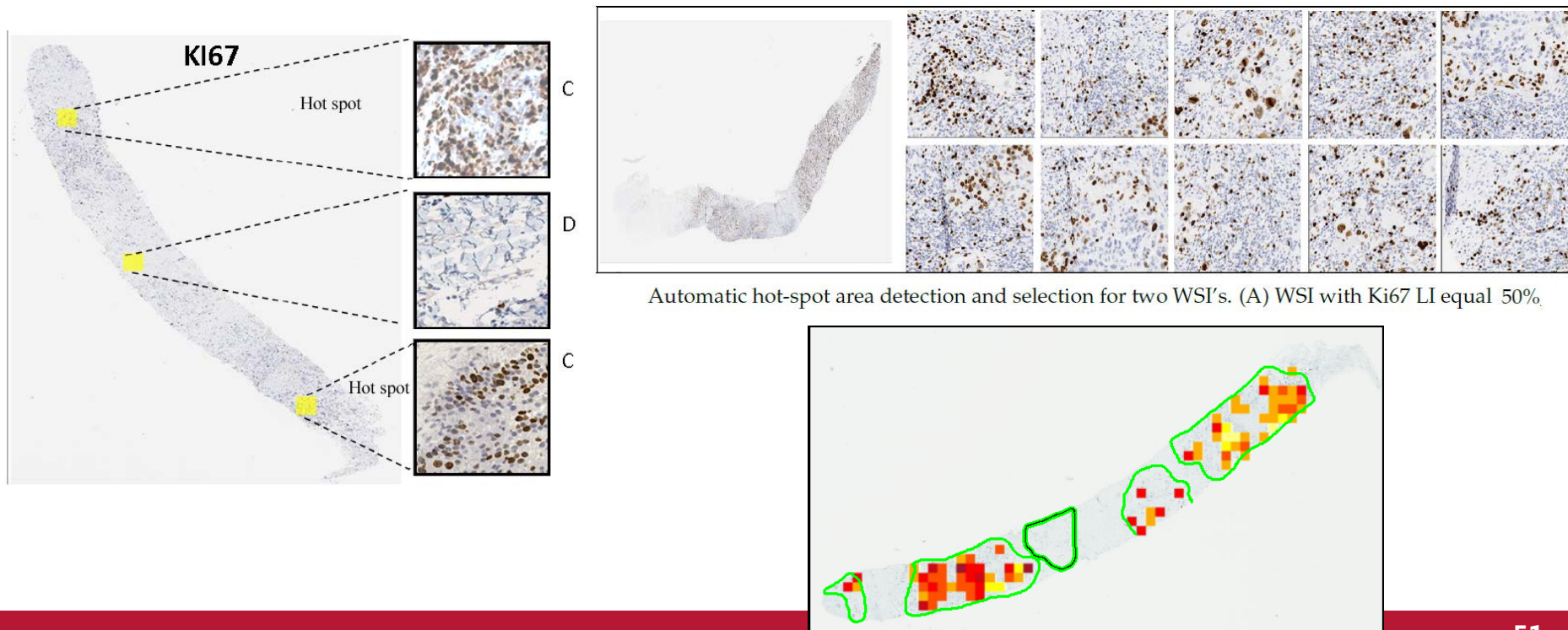
Artículo publicado: lectura adicional. Este trabajo ha sido publicado en:

- ‘Glomerulosclerosis identification in whole slide images using semantic segmentation’
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169260719311381?via%3Dihub>
- ‘Digital pathology imaging as a novel platform for standardization and globalization of quantitative nephropathology’
<https://academic.oup.com/ckj/article/10/2/176/3003371>

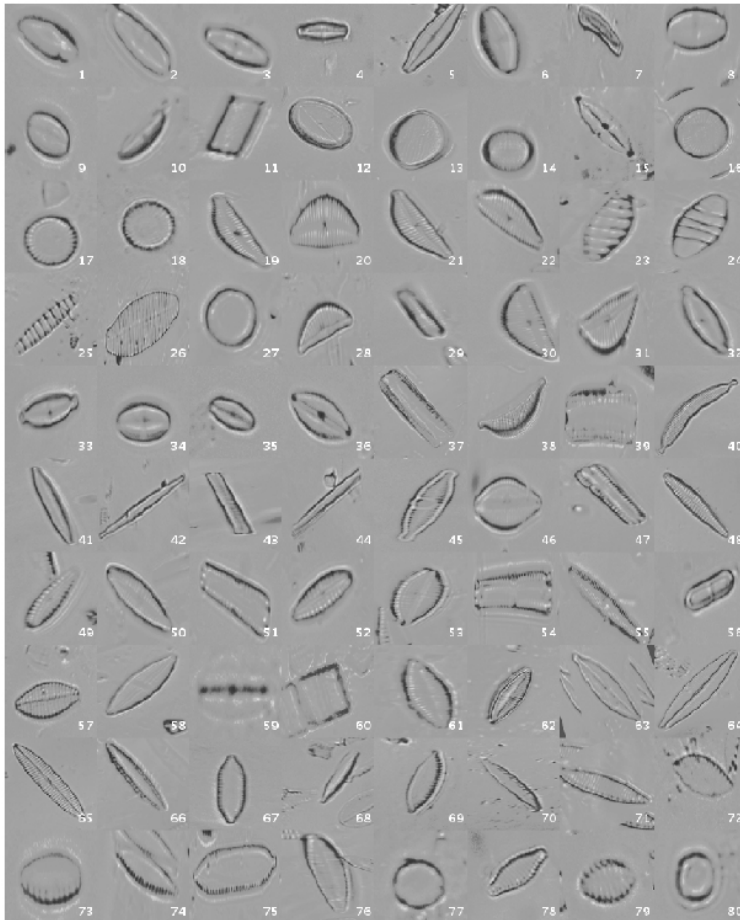
Identificación de zonas tumorales con diferentes biomarcadores

‘Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer’

<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2665774>



Clasificación de Diatomeas



Automated Diatom Classification (Part A): Handcrafted feature approaches

G Bueno, O Deniz, A Pedraza, J Ruiz-Santaquiteria, J Salido, G Cristóbal, et al.

Applied Sciences 7 (8), 753, 2017

<https://doi.org/10.3390/app7080753>

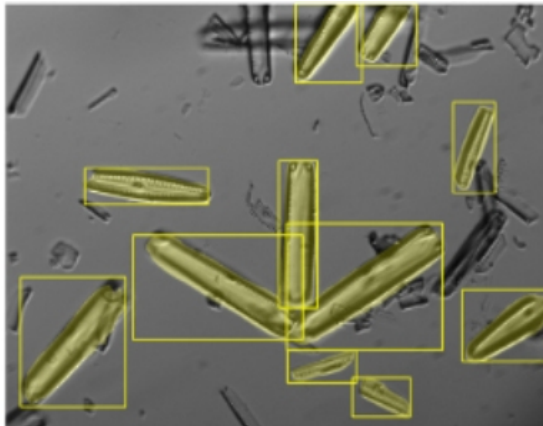
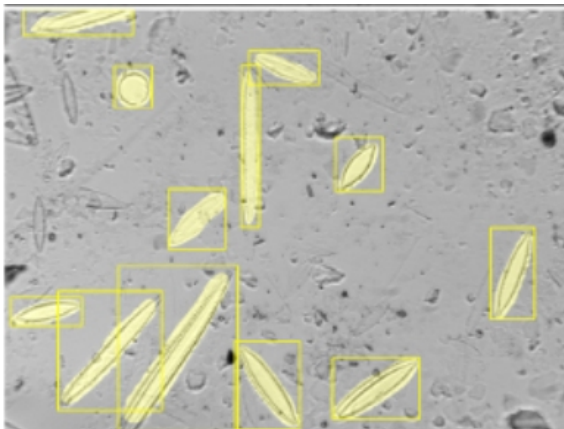
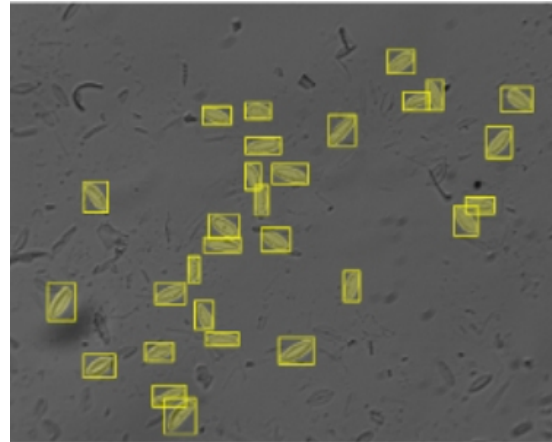
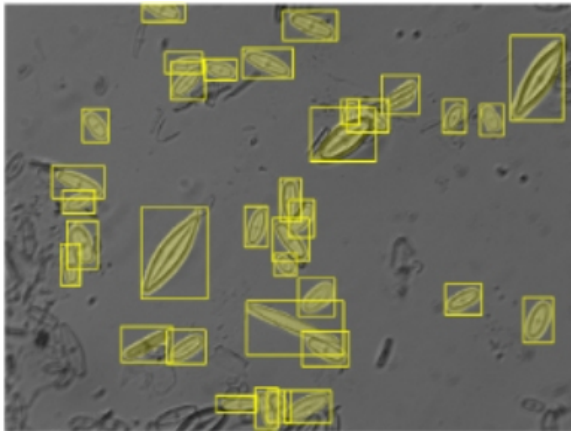
Automated Diatom Classification (Part B): A Deep Learning Approach

A Pedraza, G Bueno, O Deniz, G Cristóbal, S Blanco, M Borrego-Ramos

Applied Sciences 7 (5), 460, 2017

<https://doi.org/10.3390/app7050460>

Detección de Diatomeas



Semantic and
Instance Segmentation

Mask-RCNN - 92%

*Semantic versus instance segmentation in
microscopic algae detection*

J Ruiz-Santaquiteria, G Bueno, O Deniz, N
Vallez, G Cristobal

Engineering Applications of Artificial
Intelligence 87, 103271, 2020

<https://doi.org/10.1016/j.engappai.2019.103271>

Inference tool

File View Export Help
— □ ×

Detection

Model: YOLOv3

Threshold: 0.30

Genus classification

Model: densenet

Clustering

Unknown threshold: 0.52

Min Best Max

Species classification

Preferred model: squeezeNet

Inference

Device: cpu

Infer

Infer all images

Stop

Show annotations

Detection box: red

Classification text: blue

Apply

Files

Folder: ence_tool_unused/Southern_sample

File list:

```

/ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-0.tif
/ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-1.tif
/ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-2.tif
/ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-3.tif
/ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-4.tif
/ANT31-75.S53.A20.Chunk2_2-7.tif
/ANT31-75.S53.A20.Chunk2_2-8.tif
/Tx.PS103.st1-ANT43-2-B+A_0-0.tif
/Tx.PS103.st1-ANT43-2-B+A_0-1.tif
/Tx.PS103.st1-ANT43-2-B+A_0-2.tif

```

Annotations

Path: Visilab/Inference_tool/tfg_tests_infs

Format: PascalVOC

Convert annotations...

(5 / 15) Inferring image ANT31-47.S51.A20.Chunk1_0-4.tif --- Subclassification

Introducción

Microscopía

Hardware

Software

Resultados

Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones generales

- La microscopía digital está llena de retos (hardware, software)
- Aplicación óptima de la IA
- Es posible tener sistemas de bajo coste con calidad de imagen adecuada para algunas aplicaciones

Comparativa de Sistemas

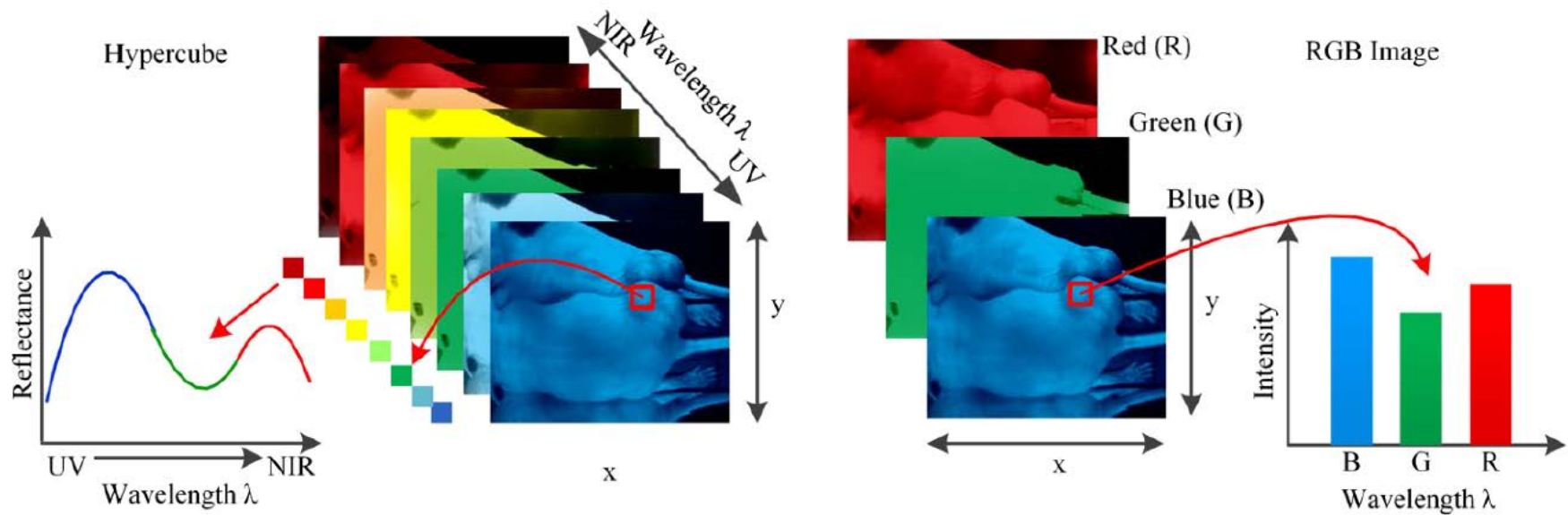
	OpenFlexure	Incubot 3D	MicroHikari3D
Objetivos 160 mm	✓	✗	✓
Objetivos ∞	✓	✓	✓
Objetivos C-Mount	✗	✗	✓
Apilamiento de enfoque	✗	✗	✓
Stitching	✗	✗	✓
Rango de movimiento	Muy limitado	Todo el porta	Todo el porta
Streaming de video	✓	✗	✓
Clasificación de imágenes	✗	✗	✓
Sistemas de iluminación	2	1	2
Cámara	Pi Camera 2 o webcam	Pi Camera 2	Pi High Quality Camera
Precio	190€	1061.79€	Acople COTS: 452€ Acople impreso 3D: 305€

Líneas futuras

- Sistema de autonivelación de la base
- Optimización de los tiempos
- Aplicación para sistemas de telemicroscopía
- Extensión a otros tipos de microscopía:
 fluorescencia, multiespectral
- Modelos de IA más óptimos

Líneas futuras

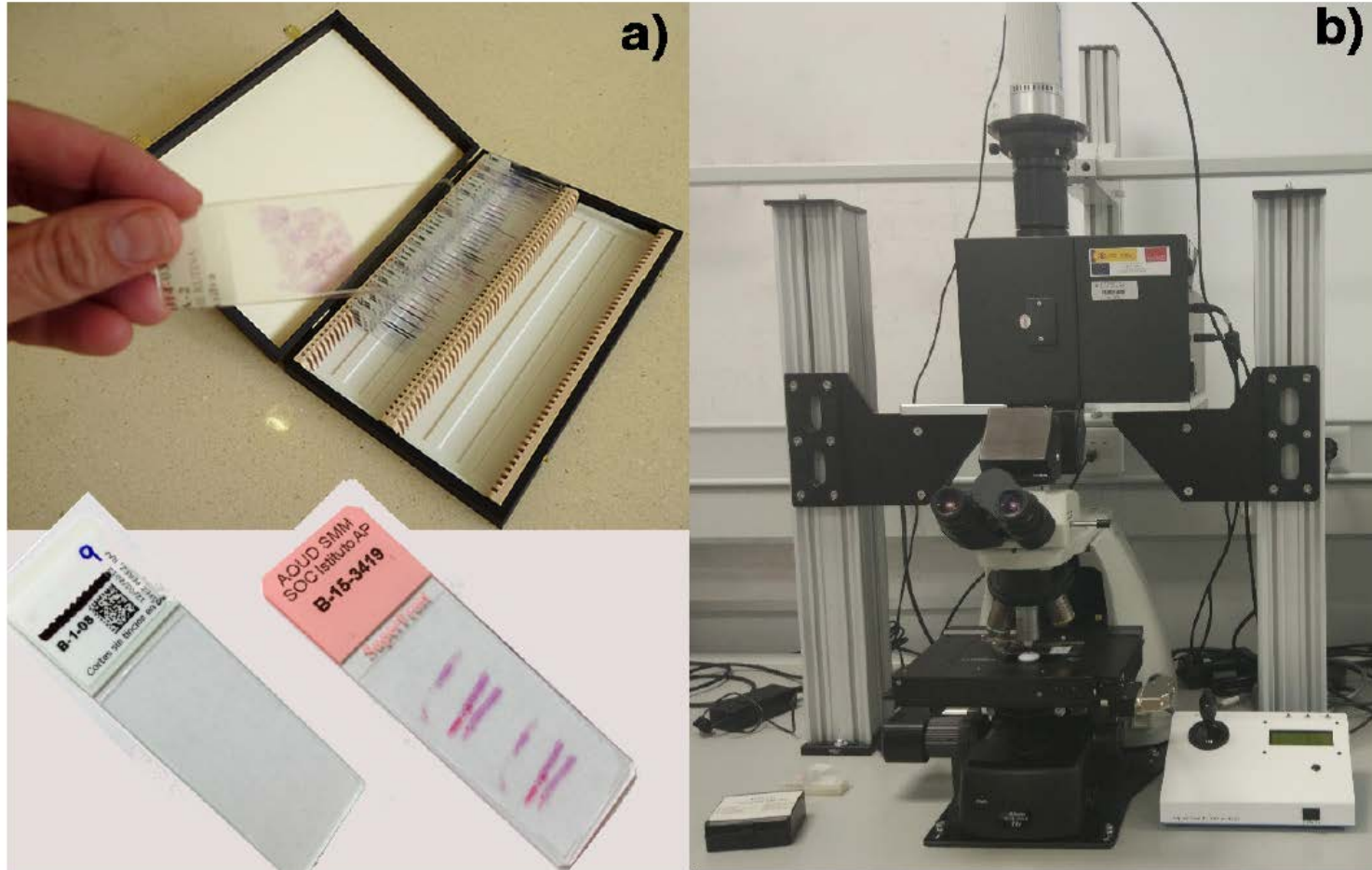
Análisis Multiespectral



Comparación entre una imagen hiperespectral (izda.) y una imagen RGB (dcha.),[LuG14])

Se ha demostrado [Moh16] cómo la luz experimenta una dispersión múltiple de las inhomogeneidades dentro de las estructuras biológicas

Líneas futuras

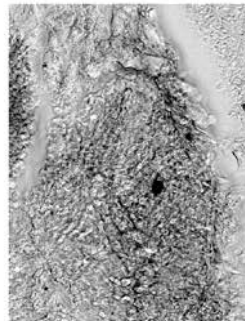


Biopsias listas para su digitalización y análisis; b) Sistema hiperespectral con pletina motorizada para adquisición de imágenes MHI WSI de rango [400nm .. 700nm].

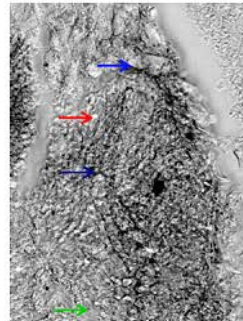
Líneas futuras



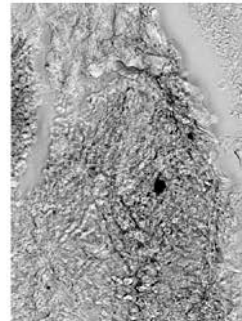
a) Muestra de biopsia de tejido mamario sin teñir



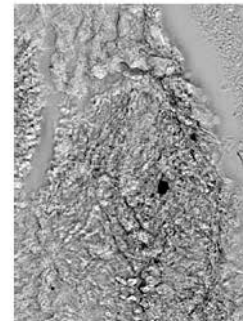
b) Imagen a 450nm



c) Imagen a 550nm

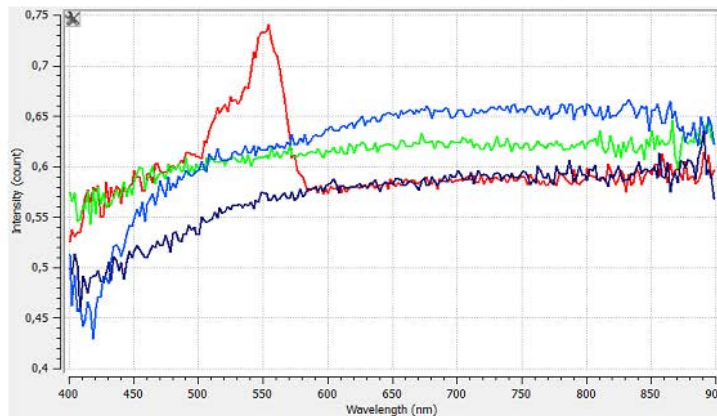


d) Imagen a 600nm

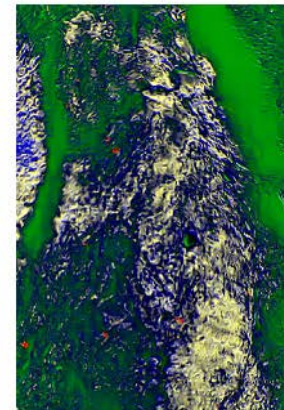


e) Imagen a 700nm

Análisis multispectral



f) Espectro de transmitancia de diferentes regiones de la muestra y su mapeo en la imagen



Análisis multispectral de una muestra de tejido mamario sin teñir

