



**Desarrollo de un dispositivo portable de visión artificial para la identificación y cuantificación in vitro de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua**

**Maria Lucia Pieschacón Chuzcano**  
**Juan Sebastián Echeverry Rey**

Universidad El Bosque  
Facultad de Ingeniería, Programa de Bioingeniería  
Bogotá, Colombia  
2023

**Desarrollo de un dispositivo portable de visión artificial para la identificación y cuantificación in vitro de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua**

**Maria Lucia Pieschacón Chuzcano**

**Juan Sebastián Echeverry Rey**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el  
título de:

**Bioingeniero**

Tutor:

Nuri Andrea Merchan Castellanos

Cotutor:

Jhonatan Avendaño Perez

Universidad El Bosque

Facultad de Ingeniería, Programa de Bioingeniería

Bogotá, Colombia

2023

# Dedicatoria

**Juan Sebastian Echeverry Rey**

En reconocimiento a los años de esfuerzo de mi familia para darme la oportunidad de culminar este proceso de la mejor manera, gracias infinitas a Dios y a todas las personas que confiaron en mí.

“Recuerda que no obtener lo que uno quiere, a veces, es un golpe de suerte maravilloso.” -Dalai Lama

**María Lucía Pieschacón Chuzcano**

En reconocimiento a Frederick Gutierrez quien siempre me motivó y me apoyó a culminar este proceso de la mejor manera y a mi familia quien me brindo amor y un apoyo incondicional.

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido.

Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos” -Marie Curie



# Agradecimientos

## **Juan Sebastián Echeverry Rey:**

Quiero expresar mi gratitud de manera especial a Dios y a mis padres, Nubia Nelcy Rey y Jose Jair Echeverry, por brindarme la oportunidad de vivir y culminar este excelente proceso. También quiero agradecer a mis hermanos, Luis Alfredo Echeverry y Jair Andres Echeverry, por apoyarme en numerosas ocasiones, por ser mi ejemplo y motivación en cada paso que he dado, y a toda mi familia por su constante impulso y preocupación.

Este primer logro universitario se lo debo a nuestros docentes como la bioingeniera Gabriela Barrero Echeverria, nuestra tutora Nuri Andrea Merchan y Jonathan Avendaño, quienes nos brindaron su tiempo, consejos y dedicación, y nos dieron la clave del éxito. Asimismo, quiero agradecer a mi compañera, Maria Lucia Pieschachon, por confiar en este

proceso, dedicar tiempo, ideas y compromiso en este trabajo de grado, y por su infinita paciencia.

Por último, quiero agradecerme por darme la oportunidad de superar mis límites y conocerme mejor. Gracias por enseñarme las herramientas que poseo y que adquiriré en este proceso de aprendizaje universitario, y por brindarme la satisfacción de culminar este proceso y obtener un título universitario. Me siento orgulloso de haber desarrollado una idea desde la Bioingeniería para impactar positivamente en una comunidad necesitada, y de haber potenciado mis valores y habilidades para ofrecer al mundo mis capacidades al servicio de los más necesitados.

### **Maria Lucia Pieschacón Chuzcano:**

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi compañero de vida Frederick. Él siempre me ha dado palabras de aliento y confianza, especialmente en aquellos momentos en los que me sentía desanimado o a punto de rendirme. Gracias a él, aprendí que si quiero alcanzar un objetivo, debo ser constante, dedicada y hacerlo con amor. Agradezco también a mis padres, Johana y Juan Carlos, por su amor incondicional y apoyo inquebrantable. Siempre han tenido paciencia conmigo y han comprendido mis decisiones en el camino que he elegido para mi vida.

Quiero extender mi gratitud a mi tutor, el Dr. Nuri Andrea Merchan,

y a mi cotutor, Msc. Jhonathan Avendaño, por creer en mis habilidades y brindarme la oportunidad de trabajar con ellos en el proyecto de grado. Gracias a su guía y enseñanzas, he podido enriquecer mis conocimientos y profundizar en esto que tanto amo.

Agradezco también a mi compañero de tesis, Juan Sebastian, por su disposición y compromiso para trabajar juntos y sacar adelante el proyecto de grado. Sin su colaboración y apoyo, no habría sido posible alcanzar nuestro objetivo.

Por último, quiero expresar mi gratitud a todos mis familiares, amigos y compañeros que me han apoyado durante todo este proceso de formación profesional. Gracias por sus palabras de aliento, sus consejos y su ayuda desinteresada en momentos cruciales. Sin su colaboración, no habría sido posible llegar hasta aquí.

# Tabla de contenido

<b>Dedicatoria</b>	<b>I</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>XXII</b>
<b>Abstract</b>	<b>XXV</b>
<b>Introducción</b>	<b>XXVII</b>
<b>1. Definición del problema</b>	<b>1</b>

<b>2. Justificación</b>	<b>13</b>
2.0.1. Microscopios existentes en el mercado. . . . .	18
<b>3. Objetivos</b>	<b>22</b>
3.1. Objetivo general . . . . .	22
3.2. Objetivos específicos . . . . .	22
<b>4. Marco referencial</b>	<b>24</b>
4.1. Patología del <i>Cryptosporidium</i> spp. . . . .	24
4.1.1. Patología . . . . .	24
4.1.2. Taxonomía . . . . .	26
4.1.3. Morfología . . . . .	26
4.1.4. Métodos de identificación del <i>Cryptosporidium</i> spp. . . . .	31

4.1.5.	Métodos de cultivo de <i>Cryptosporidium</i> spp. . . .	35
4.2.	Generalidades del microscopio. . . . .	36
4.2.1.	Sistema óptico. . . . .	37
4.2.2.	Sistema mecánico. . . . .	39
4.2.3.	Sistema de iluminación. . . . .	41
4.3.	Procesamiento de imágenes. . . . .	41
4.3.1.	Técnicas de filtrado. . . . .	41
4.3.2.	Preprocesamiento: . . . . .	43
4.3.3.	Segmentación. . . . .	43
4.3.4.	Transformada de Hough. . . . .	45
4.3.5.	Representación de una imagen. . . . .	45
4.3.6.	Reconocimiento e interpretación. . . . .	46

4.4. Detección de Microorganismos por procesamiento de Imágenes. . . . .	46
<b>5. Requerimientos</b>	<b>49</b>
5.1. Requerimientos funcionales: . . . . .	49
5.2. Requerimientos técnicos . . . . .	51
5.3. Requerimientos de restricción . . . . .	52
<b>6. Metodología</b>	<b>54</b>
<b>7. Resultados y discusión</b>	<b>121</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>212</b>
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>215</b>

# Índice de tablas

1.1. Distribución de 61 de las 325 Instituciones avaladas por el Ministerio de Salud y Protección social para prestar servicios de análisis orgánico, inorgánico y microbiológico de aguas según Resolución 1615 del 2015. . . . .	11
2.1. Prevalencia de infección por <i>Cryptosporidium</i> spp. en la población colombiana entre 1985 y 2020. Instituto Nacional de Salud (INS). Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos (ERIA) y Plaguicidas. . . . .	16
2.2. Comparación de microscopios digitales (Parte 1) . . . . .	18
2.3. Comparación de microscopios digitales (Parte 2) . . . . .	19



7.1. Detalle de componentes y costos prototipo 1 . . . . .	146
7.2. Detalle de componentes y costos prototipo 2 . . . . .	150
7.3. Detalle de componentes y costos prototipo 3 . . . . .	154
7.4. Detalle de componentes y costos prototipo 4 . . . . .	161

# Índice de figuras

1.1. Árbol del problema . . . . .	12
4.1. Esquema de un Ooquiste esporulado. Tomado de (La Parte-Pérez María Antonia, 2016) . . . . .	27
4.2. Visualización por métodos de microscopia del <i>Cryptosporidium</i> spp. con tinción de Zielh Neelsen.(La Parte-Pérez María Antonia, 2016) . . . . .	28
4.3. Ciclo de vida <i>Cryptosporidium</i> spp. (INS 2018) . . . . .	30
4.4. Microscopio óptico convencional . . . . .	37

6.1. Metodología general basada en las principales 4 fases del proyecto de grado (Elaboración propia). . . . .	56
6.2. Escala de evaluación de los requerimientos (Elaboración propia). . . . .	62
6.3. Escala de evaluación de los criterios (Elaboración propia). . . . .	63
6.4. Tabla de Aumentos entre el complejo de lentes según su conjugación (Diez, 2020). . . . .	66
6.5. Metodología objetivo 2 (Elaboración propia). . . . .	67
6.6. Implementación del SM 2310 para la recolección de datos de pH y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia). . . . .	70
6.7. Implementación del SM 2130 para la recolección de datos de turbidez y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia). . . . .	71
6.8. Implementación del SM 2510 para la recolección de datos de conductividad y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia). . . . .	71

6.9. Preparación de los concentrados con la muestra patrón (Elaboración propia). . . . .	73
6.10. Preparación de las muestras en las láminas para el pro- ceso de tinción y (Elaboración propia). . . . .	74
6.11. Tinción de Ziehl Neelsen (Elaboración propia). . . . .	76
6.12. Procesamiento y observación de las laminas con tinción (Elaboración propia). . . . .	77
6.13. Diagrama de clases ordenamiento de la base de datos (Elaboración propia). . . . .	82
6.14. Diagrama de flujo creación base de datos (Elaboración propia). Para ver mejor ver el anexo 7. . . . .	84
6.15. Diagrama de flujo HSV (Elaboración propia). Para ver mejor ver el anexo 9. . . . .	92
6.16. Diagrama de clases identificación de características (Ela- boración propia). . . . .	95
6.17. Diagrama de flujo identificación de características de <i>Cry- ptosporidium</i> spp.(Elaboración propia). . . . .	98

6.18. Diagrama de clases evaluación de la extracción de características (Elaboración propia). Para ver mejor ver el anexo 10. . . . .	100
6.19. Diagrama de flujo de la evaluación del método de identificación (Elaboración propia). . . . .	103
6.20. Arquitectura del sistema backend (Elaboración propia). .	105
6.21. User flow de la app movile (Elaboración propia). Para ver mejor mirar el anexo 11. . . . .	107
6.22. Diseño UX/UI (Elaboración propia). . . . .	108
6.23. Diagrama del funcionamiento del codigo en fluttler (Elaboración propia). Para ver mejor vea el anexó 12. . . . .	109
6.24. Diagrama de clases matriz de confusión (Elaboración propia). . . . .	113
6.25. Diagrama de flujo de la matriz de confusion(Elaboración propia). . . . .	118
6.26. Evaluación de las muestras en el servicio de laboratorio contratado (Elaboración propia). . . . .	120

7.1. Matriz QFD de los requerimientos relacionados con el microorganismo y el dispositivo (Elaboración propia). . .	130
7.2. Priorización de requerimientos relacionados con el microorganismo y el dispositivo (Elaboración propia). . . .	131
7.3. Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.2 para la elección de los materiales de construcción del dispositivo (Elaboración propia). . . . .	132
7.4. Valores de referencia de cada material (Elaboración propia). . . . .	133
7.5. Evaluación de materiales (Elaboración propia). . . . .	134
7.6. Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.2 para el sistema de enfoque (Elaboración propia). . . . .	135
7.7. Evaluación del sistema de enfoque (Elaboración propia). . . . .	136
7.8. Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.3 para el sistema de iluminación (Elaboración propia). . . . .	138

7.9. Evaluación del sistema de iluminación (Elaboración propia). . . . .	139
7.10. (A) Prototipo 1 con sistema de iluminación acoplado. (B) Prototipo 1 sin sistema de iluminación acoplado. . . . .	147
7.11. (1) Visualización de muestra de Chlorella a 100 x . (2) Visualización de muestra de Chlorella a 200 x . (3) Visualización de muestra de Chlorella a 250 x . . . . .	148
7.12. (5) Adaptación de extensión de tubo con montura RMS vista frontal. (6) Adaptación de extensión de tubo con montura RMS vista lateral. . . . .	151
7.13. (A) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x y modo de iluminación tenue. (B) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x. y modo de iluminación media. (C) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x y modo de iluminación Alta. . . . .	152
7.14. Estructura principal prototipo 3 (Elaboración propia)para ver mejor consulte el anexo 5. . . . .	157

7.15. Resultados de observación de <i>Chlorella</i> con una conjugación de lentes de 1000x y un sistema de iluminación regulable manualmente. . . . .	159
7.16. Estructura principal del sistema de enfoque del prototipo 4.	162
7.17. Componentes del prototipo 4 . . . . .	168
7.18. Prototipo 4 sin montaje del sistema de iluminación y complejo de lentes. (P2) Prototipo 4 con sistemas acoplados. . . . .	169
7.19. Observación de muestra de <i>Cryptosporidium</i> spp. en muestras con tinción de (ZN modificada) . . . . .	171
7.20. Medición de pH con Phmetro digital portátil Hanna HI98130 (Elaboración propia). . . . .	172
7.21. Medición de Turbidez con turbidímetro HACH 2100P (Elaboración propia). . . . .	173
7.22. Medición de conductividad con multiparámetro marca Hanna Instruments, modelo HI98194 (Elaboración propia).	173



7.23. Comparación de las mediciones de los diferentes parámetros según la muestra (Elaboración propia). . . . .	174
7.24. Mediciones de pH y turbidez por muestra (Elaboración propia). . . . .	174
7.25. Mediciones de conductividad dado en $\mu\text{S}/\text{cm}$ por muestra (Elaboración propia). . . . .	175
7.26. Marcación de láminas (Elaboración propia) . . . . .	178
7.27. Mosaico de imágenes del proceso de tinción (Elaboración propia). . . . .	180
7.28. Mosaico de resultados obtenidos de las muestras teñidas con ZN modificada (Elaboración propia). . . . .	180
7.29. Resultado del ordenamiento de imágenes (Elaboración propia). . . . .	183
7.30. Imagen utilizada para encontrar los valores de Upper y Lower en el espacio de color HSV (Elaboración propia). . . . .	190
7.31. Diagrama de flujo HSV (Elaboración propia). . . . .	192

7.32. Resultado del algoritmo de identificación de características (Elaboración propia). . . . .	193
7.33. Resultado final del procesamiento del código . . . . .	195
7.34. Primera pantalla para tomar o subir una foto de <i>Cryptosporidium</i> spp.(Elaboración propia). . . . .	196
7.35. Tercera pantalla de historial y muestra de resultados (Elaboración propia). . . . .	197
7.36. Tercera pantalla de historial y muestra de resultados (Elaboración propia). . . . .	198
7.37. Resultados matriz de confusión control positivo y mapas de calor . . . . .	199
7.38. Resultados matriz de confusión control negativo y mapas de calor . . . . .	200
7.39. Resultados matriz de confusión lamina 1 y mapas de calor	201
7.40. Resultados matriz de confusión lamina 2 y mapas de calor	202
7.41. Resultados matriz de confusión lamina 3 y mapas de calor	203

7.42. Resultados matriz de confusión lamina 4 y mapas de calor	204
7.43. Resultados matriz de confusión lamina 5 y mapas de calor	205
7.44. Resultados matriz de confusión lamina 6 y mapas de calor	206
7.45. Tabla de resultados laboratorio clinico . . . . .	208
7.46. Desviación estándar muestral Laboratorio clínico . . . .	209
7.47. Exactitud arrojada por el laboratorio . . . . .	209
7.48. Promedio de (oo)quistes encontrados por muestra proce- sada con el dispositivo. . . . .	209
7.49. Desviación estándar muestral dispositivo . . . . .	210
7.50. Exactitud calculada para los datos arrojados por el dis- positivo . . . . .	210

# Resumen

Este trabajo aborda el desarrollo de un dispositivo portable de visión artificial destinado a la identificación y cuantificación in vitro de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua. El propósito es proporcionar una herramienta aplicable en acuíferos insuficientemente caracterizados o con procesos de sanitización incompletos, como los métodos granulares de filtración comúnmente utilizados en áreas rurales, que representan el 71 % del territorio nacional. Por ende, se llevó a cabo un proceso de ingeniería que parte del levantamiento de requerimientos para diseñar y construir un dispositivo portable capaz de alcanzar 1000 aumentos mediante un conjunto de lentes, sistemas mecánicos y eléctricos. Estos componentes permiten obtener una proyección clara de *Cryptosporidium* spp. mediante técnicas de microscopía, diseñadas para visualizar elementos en el rango de 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$  con una resolución de máximo 1 mm en los ejes de movimiento.

La herramienta desarrollada permite realizar un barrido de 30 campos al azar en una lámina porta muestras, que contenga una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  de agua filtrada con características específicas. Se utiliza una suspensión comercial de *Cryptosporidium* spp. para extraer características morfológicas y morfométricas del parásito, responsable de 143 muertes anuales a nivel nacional. Dada la dosis infecciosa de hasta 1 (oo)quiste/mL, se implementa un código de visión artificial que, a través de 270 imágenes del microorganismo, identifica y cuantifica los (oo)quistes en las muestras de agua, resaltando su tamaño, color y forma mediante la tinción de Zielh Neelsen.

Para validar el sistema, se empleó una matriz de confusión para medir la precisión, exactitud, sensibilidad y puntuación del algoritmo. Posteriormente, se compararon estos resultados con la prueba avalada por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, utilizada en laboratorios de salud pública a nivel nacional. El sistema exhibió una precisión muestral del 0.301 y una exactitud de 7.69, confirmando su fiabilidad, seguridad y facilidad de uso. Los resultados de detección y análisis de muestras se presentan de manera accesible en una aplicación móvil, proporcionando trazabilidad y facilitando la evaluación para el usuario.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp., dispositivo portable, visión artificial, identificación in vitro, cuantificación, métodos granulares de filtración, microscopía, código de visión artificial, Zielh Neelsen, matriz de

confusión, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

# Abstract

This work addresses the development of a portable artificial vision device aimed at the *in vitro* identification and quantification of *Cryptosporidium* spp. in water samples. The purpose is to provide a tool applicable in insufficiently characterized aquifers or with incomplete sanitization processes, such as the granular filtration methods commonly used in rural areas, representing 71 % of the national territory. Therefore, an engineering process was carried out that starts with the requirements survey to design and build a device capable of achieving 1000 magnifications through a set of lenses, mechanical, and electrical systems. These components allow obtaining a clear projection of *Cryptosporidium* spp. using microscopy techniques designed to visualize elements in the range of 0.2 to 0.8  $\mu\text{m}$  with a resolution max of 1 mm on the axes of movement.

The developed tool allows scanning 30 random fields on a sample slide, containing a 1  $\mu\text{L}$  aliquot of filtered water with specific charac-

teristics. A commercial suspension of *Cryptosporidium* spp. is used to extract morphological and morphometric features of the parasite, responsible for 143 deaths annually nationwide. Given the infectious dose of up to 1 (oo)cyst/mL, an artificial vision code is implemented that, through 270 images of the microorganism, identifies and quantifies the (oo)cysts in water samples, highlighting their size, color, and shape through Zielh Neelsen staining.

To validate the system, a confusion matrix was used to measure the accuracy, precision, sensitivity, and F1 score of the algorithm. Subsequently, these results were compared with the test endorsed by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, used in public health laboratories nationwide. The system exhibited a sample accuracy of 0.301 and an accuracy of 7.69, confirming its reliability, safety, and ease of use. Detection and sample analysis results are presented in an accessible mobile application, providing traceability and facilitating evaluation for the user.

**Keywords:** *Cryptosporidium* spp., portable device, computer vision, in vitro identification, quantification, granular filtration methods, microscopy, artificial vision code, Zielh Neelsen, confusion matrix, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.



# Introducción

Las Enfermedades Vehiculizadas por el Agua (EVA), son un problema a nivel global que ha dado origen a numerosas investigaciones alrededor del mundo donde las infecciones gastrointestinales agudas son el causante del 1,42 % de mortalidad en países como Colombia (Webmaster, 2022). Este tipo de afecciones a la salud son causadas por microorganismos vehiculizados por el agua, capaces de resistir a métodos de sanitización como lo es el *Cryptosporidium* spp. el cual con una baja dosis infecciosa es capaz de producir criptosporidiosis, una enfermedad diarreica aguda (EDA) la cual se manifiesta en mayor medida en etapas de infancia, teniendo una tasa de mortalidad del 34.5 casos por cada 100.000 menores de 5 años, siendo las poblaciones rurales del país los más afectados por la falta de caracterización y evaluación del agua que usan para su consumo (Cordoba, 2018).

Según el IDEAM (2018), las aguas subterráneas son explotadas en

un 71.7 % en mayor medida por las poblaciones rurales alejadas de procesos de sanitización eficientes, teniendo que acudir a métodos de filtración por métodos granulares, comúnmente acompañadas por exposición a luz UV, una de las principales preocupaciones de estos métodos, es la contaminación cruzada ya que al consumir agua con presencia de *Cryptosporidium* spp., este es capaz de completar su ciclo de fecundación, maduración y reproducción en 7 días, destruyendo las células epiteliales del huésped, permitiendo el ingreso de bacterias y hongos con mayor facilidad, lo que puede resultar en complicaciones más severas en la salud de los seres vivos al punto de terminar fatalmente en cuadros de deshidratación severa y sepsis microbiana (Hernandez, 2018).

Actualmente, se hace obligatoria la caracterización y análisis de los acuíferos destinados para consumo humano por medio de la resolución 2115 del 2007, pero el mayor problema con esto es la falta de instituciones avaladas por el ministerio de salud y protección social dado por la resolución 1615 del 2015, las cuales por medio de los métodos acogidos del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, son capaces de identificar y cuantificar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua con una gran inversión en equipos y mano de obra calificada, por lo que se evidencia la necesidad de un método accesible y de bajo costo que sea capaz de identificar la presencia del microorganismo *Cryptosporidium* spp. en el agua de consumo. Para esto se realizó el diseño y la construcción del prototipo portable, el cual le brinda las herramientas necesarias al usuario para la identificación, caracterización y

toma de fotos del *Cryptosporidium* spp. con el fin de construir un dataset para reconocer las características de color, tamaño y forma dado al aplicar métodos de microscopia binocular y la tinción de Zielh Neelsen, realizando un algoritmo de identificación de las características morfológicas y morfométricas.

Como etapa final se construyó una app móvil basada en la experiencia de usuario para el reporte de los resultados los cuales son validados por medio de la comparación de resultados obtenidos con el prototipo y con la técnica manual de tinción y microscopía, avalada por la resolución 2115 del 2009 y el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

# Definición del problema

Las fuentes hídricas son uno de los recursos más importantes de las regiones de Colombia. El área potencial de estos acuíferos equivale al 74 % del territorio nacional, con reservas estimadas de 5.848 km<sup>3</sup>. Sin embargo, el 71,7 % de los acuíferos identificados no se pueden aprovechar debido a la falta de conocimiento con respecto a la disponibilidad de estos recursos (IDEAM, 2018).

Según el IDEAM, 2011, en Colombia, la demanda anual equivale a 35.987,1 millones de m<sup>3</sup> de agua, siendo así el recurso más explotado a nivel nacional, dado su uso para abastecimiento a cerca de 45.5 millones de personas a nivel nacional (DANE, 2021). La importancia de este recurso somete que bajo su uso se derivan grandes problemáticas ambientales y sociales que ponen en riesgo la salud de la población que

requiere de su utilización; según un estudio sobre el uso y accesibilidad de las fuentes hídricas a nivel Colombia, el 73 % de la población nacional cuentan con abastecimiento de agua gestionado de manera segura, llegando a un 40 % de la población en áreas rurales, asimismo, aun el 17 % de la población cuentan con cobertura del saneamiento gestionado de manera segura, sin embargo se genera una brecha de acceso y consumo de agua insegura del 83 %, siendo las áreas rurales las más afectadas (MUNDIAL, 2021).

Gracias a esta brecha se presenta en gran proporción a nivel nacional enfermedades vehiculizadas por el agua (EVA) siendo un generador de infecciones gastrointestinales e inmunosupresoras debido a la cantidad de microorganismos capaces de generar al año 856.063 casos reportados de EDAS o enfermedades diarreicas agudas (Webmaster, 2022), teniendo un 1,42 % de mortalidad, dejando entre el 2019-2021 un total de 143 muertes reportadas ante el INS (Bloomberg, 2022), ante la cifra de muertes acumuladas por año, estableciendo como un problema de salud pública la calidad del agua para consumo humano y la identificación y clasificación temprana de las fuentes hídricas ( WHO, 2023), siendo los microorganismos como *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella*, *Campylobacter* yeyuni, *Staphylococcus aureus*, *Cryptosporidium* spp, *Giardia* etc. (Fernando, 2004) los agentes patógenos más presentes en las infecciones gastrointestinales en Colombia.

La infección por *Cryptosporidium* spp. se ha convertido en una pro-

blemática de talla mundial. En donde se han encontrado reportes de grandes brotes de criptosporidiosis transmitidos por factores problema como el agua y los alimentos, en varios países indican que este parásito se encuentra en todo el mundo (Cacció, 2016). Una de las entidades más importantes a nivel mundial, el CDC, en un análisis hecho desde los años 1983 a 2018, se detectaron 362 brotes, dejando un total de 457.316 enfermos, internando por complicaciones a 429 pacientes y teniendo un total de 50 muertes asociadas al consumo de agua contaminada por *Cryptosporidium* spp.

El *Cryptosporidium* spp. es un microorganismo que se identificó taxonómicamente como un coccidio de hábitat extracelular, protozoo del tipo apicomplexa, clase sporozoea, subclase coccidia, orden eucoccidiida, suborden eimeriina, familia cryptosporidiidae, género *Cryptosporidium* (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 6th Edition, 2020).

Actualmente es posible reconocer cerca de 38 especies de *Cryptosporidium* spp., en donde aproximadamente cerca de 19 de estas están asociadas con la patogenicidad humana (LUCIA OSPINA, 2022). Este microorganismo es conocido por generar una infección al intestino, siendo su forma de (oo)quiste bastante resistente y duradera en ambientes variados, encontrando dosis bajas de infección entre 1 y 30 (oo)quistes (LUCIA OSPINA, 2022). Los (oo)quistes pueden infectar al huésped mediante la ingestión de alimentos o líquidos con presencia del micro-

organismo, lo mas común en estos casos de infección se presentan en personas con acceso a aguas no tratadas o por la ingestión de aguas de piscina con tratamientos incompletos o sin un ciclo de tratamiento (LUCIA OSPINA, 2022). Al infectarse, el (oo)quiste llega al intestino, liberando los esporozoitos, fijándose en el último tercio del yeyuno y el íleon, afectando las microvellosidades de las células epiteliales intestinales, absorbiendo nutrientes y destruyendo la estructura de las células (Tzipori, 1983), generando SDA (Síndrome de Diarrea Aguda) (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

Después del período de incubación que puede durar de 7 a 10 días, cerca del 90 % de los pacientes infectados presentan deposiciones acuositas que tienen una duración aproximada de dos semanas, asociado a náuseas, emesis, calambres abdominales y fiebre. La transmisión de *Cryptosporidium* spp. se produce por vía fecal-oral y puede ser de manera directa, es decir, de persona a persona, de animal a animal o zoonótico; o de manera indirecta, es decir, a través del agua o de los alimentos, de manera directa, se identifica que la transmisión persona a persona es la principal fuente de infección, ya que su ciclo de infección puede eliminar en las heces de los huéspedes entre  $10^8$  y  $10^{10}$  (oo)quistes diariamente, según Blokker et al (2005), 1 mg de heces puede contener  $10^5$  (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. También se ha encontrado casos de infección por transmisión sexual (HUNTER, 2005).

Los procesos de sanitización y desinfección para la eliminación de

este microorganismo han demostrado su alta resistencia y adaptabilidad en ambientes de altas concentraciones de desinfectantes, siendo poco eficaces en su inactivación, encontrando que en concentraciones como la requerida para inactivar *E.coli*, no son suficiente para eliminar por completo los (oo)quistes de este parásito, se encuentran estudios donde se afirma que *Cryptosporidium* spp. es uno de los organismos más resistentes en el agua y no se ha observado inactivación incluso después de 18 horas de tiempo de contacto con cloro a concentraciones de 2-5 ppm, también que debido a su pequeño tamaño, baja dosis infecciosa y alta tolerancia al cloro que es el principal desinfectante utilizado en las piscinas y plantas de tratamiento, lo hacen un reto para su inactivación y detección siendo aún más peligroso en fuentes hídricas con tipos de procesos de sanitización y desinfección incompletos como lo son los métodos de filtración con medios granulares, usados de manera más frecuente en las áreas rurales, estos métodos están compuestos de etapas de materiales neutralizadores, granulados como lo son el carbón activado, resinas iónicas y materiales cerámicos que comúnmente están apoyados por procesos de cloración o exposición a luz Uv, el líquido al exponerse a este método, adquiere propiedades de Ph entre 5.5-9, turbidez de 1 a 4 NTU y conductividades de 50-1.500 mmhos/cm, siendo el conjunto de estas características fisicoquímicas junto a otras más, las apropiadas para que el agua sea apta para uso y consumo humano.(LUCÍA OSPINA, 2022)

Para la detección de *Cryptosporidium* spp., se usan diferentes técnicas donde la mayoría se centra en principios de microscopía con ayuda



de tinciones y evaluaciones moleculares.

El método más usado y adoptado por Colombia es el 1623.1 (INS, 2018) se considera el estándar de oro, compuesto por varias etapas, siendo las siguientes:

1. La filtración de grandes volúmenes de agua (mínimo 10 litros) que se realiza para capturar las formas quísticas de los parásitos de interés, mediante el uso de un filtro con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ .(INS, 2018)
2. Sistema de elución y concentración por centrifugación, donde se realiza una ISM en la donde los (oo)quistes presentes en el sedimento son purificados mediante el uso de los imanes y partículas cargadas magnéticamente recubiertas por anticuerpos específicos.
3. El análisis de inmunofluorescencia (IF) se hace mediante tinción con isocianato de fluoresceína, (4,6-diamidinofenilindol) y microscopía de contraste de interferencia diferencial.

Este método tiene una eficiencia de recuperación (ER) de 60-90 % para *Cryptosporidium* spp., lo que permite la detección y cuantificación en límites de detección de 0,2-0,5 (oo)quistes/L; en otros estudios se ha demostrado que este método ha podido calcular el límite de detección sobre el supuesto que al menos un quiste u (oo)quiste puede ser detectado, de-

finiendo éste límite en 1 (oo)quiste en 10 litros o 0.1 (oo)quiste por litro (INS, 2018).

Dentro de las técnicas antes mencionadas se identifica el costo elevado y el uso de algunos equipos y reactivos como el microscopio de fluorescencia que tiene un costo entre los 129.337.854 COP (INSTRUMENTALIA, 2023) y la Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) que se encuentra en presentaciones de 250 mL con un valor aproximado de 1.353.985 COP (AVANTOR, 2021) también se encuentran los sistemas de filtrado y elusión IDEXX y ENVIROCHECK con equipos con costos estimados de 5.000.000 COP a 10.000.000 COP (HACH, 2021) generando una inversión en equipos y reactivos de aproximadamente 138.691.839 COP por lo que pocas entidades son capaces de poseerlas. Esta metodología tiene una eficiencia de detección y cuantificación del 99 %, pero como desventaja se identifica la demanda de tiempo, ya que para entregar resultados se demora aproximadamente 15 días y sumado la lejanía de las entidades que prestan este servicio, se vuelve inaccesible para las comunidades más vulnerables a sufrir esta problemática.

Esta técnica se apoya en principios de microscopía y evaluación molecular. La reacción en cadena polimerasa (PCR), es usada para determinar la presencia o no presencia de la especie. También se encuentra la Amplificación isotérmica (LAMP), que al no tener termociclos variables, brinda un bajo costo pero con un mayor requerimiento de primers y de tiempo a comparación de una PCR tradicional. En esta técnica se

identifica una menor demanda de tiempo y tiene una poca especificidad, ya que no cuantifica la cantidad de microorganismos en las muestras, solo dice la especie que se encuentra en ellas (Arnedo et al., 2008). Los problemas que todas las técnicas tienen en común se centran en el error humano, generando más costos (Briceño, 2018).

El resultado de cualquier técnica a la final será el procesar una muestra por medio de una observación, con el fin de identificar su presencia dadas las características biológicas, morfológicas y genéticas propias del microorganismo (Davidson, 2018). Un factor relevante para este proyecto es el valor de los equipos y reactivos, los cuales rondan entre los 9.231.373 COP a los 139.000.000 COP (Microsystem, 2021), por lo que al ser tan variado el tiempo de evaluación, según la técnica, es necesario centrarse en los métodos de detección rápida como son los métodos de microscopía tradicional para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

Se tiene como referencia que la técnica de detección clínica es la microscopía en muestras de heces fecales usando la tinción de Ziehl-Neelsen modificada para *Cryptosporidium* spp., la cual tiene una duración en la identificación del microorganismo, de 30 a 40 minutos, requiriendo entrenamiento y experiencia en la visualización de los (oo)quistes, se puede afirmar que la microscopía no requiere necesariamente equipos o reactivos muy costosos, siendo la técnica más accesible, a pesar de ello, es un trabajo intensivo, subjetivo y requiere una experiencia significativa que puede inducir sesgos. El uso de tinción de anticuerpos fluorescentes

ha aumentado la sensibilidad y la especificidad de la microscopía, pero aún requiere mucho tiempo y un microscopista experto siendo el factor humano el mayor fallo en la técnica. (Arboleda, 2021).

El análisis de costos parte de conocer el valor de las diferentes tecnologías que están en el mercado, tal como se puede identificar en las siguientes técnicas usadas es el análisis de aguas:

1. Zielh Neelsen (Arboleda, 2021) usa técnicas de microscopía por un valor estimado de \$285.000 COP y un tiempo de 45 min.
2. Dimetilsulfóxido (DMSO) (Microsystem, 2021) usa técnicas de microscopía con tinciones específicas por un valor estimado de \$115.000 COP y de un tiempo de 3 horas y 45 min.
3. EPA (Gold standard, 1623.1) la cual usa una metodología estructurada que parte de la recolección de las muestras, pasa por un proceso de filtrado, de elución, de concentración, purificación, montaje en lámina, secado, tinción y evaluación molecular, esta metodología se presta como servicio en un valor estimado de \$3.000.000 COP (Javeriana, 2018) y con un tiempo promedio de entrega de resultados de 15 días. Este método se fundamenta en cuantificar variables inorgánicas y orgánicas con el fin de dar una caracterización según normativa 2115 del 2007, determinando si la muestra de agua es o no apta para el consumo (Javeriana, 2018).

Dejando claro que los altos costos de las técnicas y equipos usados para la evaluación de muestras de agua hacen inviable la accesibilidad por parte de las áreas rurales, dejando una brecha enorme de caracterización de las fuentes hídricas destinadas para consumo humano, por ende es necesario la construcción de una herramienta que baje los costos de evaluación de las aguas contaminadas con *cryptosporidium* spp. la cual tenga en cuenta los estándares de calidad y los métodos ya estandarizados con el fin de lograr un sistema de detección y cuantificación, seguro, ligero y barato.

Colombia cuenta con 42 Instituciones avaladas por la EPA para prestar servicios de identificación de *Cryptosporidium* spp. en muestras coprológicas y aguas por medio de 2 técnicas, la técnica de Ziehl neelsen e inmunofluorescencia directa, en donde se cuenta con una eficacia de detección del 65 % y 85 % respectivamente (Arnedo, 2008), estas 325 instituciones se dividen en los departamentos estando concentradas de Manera relevante de la siguiente manera:

DEPARTAMENTO	PORCENTAJE
BOYACA	2,15 (7)
CUNDINAMARCA	1,23 (4)
AMAZONAS	0,30 (1)
BOGOTÁ	5,84 (19)
META	2,15 (7)
GUAJIRA	0,30 (1)
ANTIOQUIA	3,38 (11)
ARAUCA	1,23 (4)
ATLANTICO	2,15 (7)

Tabla 1.1: Distribución de 61 de las 325 Instituciones avaladas por el Ministerio de Salud y Protección social para prestar servicios de análisis orgánico, inorgánico y microbiológico de aguas según Resolución 1615 del 2015.

Según la tabla anterior, se puede ver una gran problemática con la cobertura con las instituciones y laboratorios avalados por la resolución 1615 del 2015, causando una gran brecha en la seguridad alimentaria y correcta caracterización de las fuentes hídricas usadas para el consumo humano en los departamentos como la Guajira, Cundinamarca, Amazonas, entre otros.

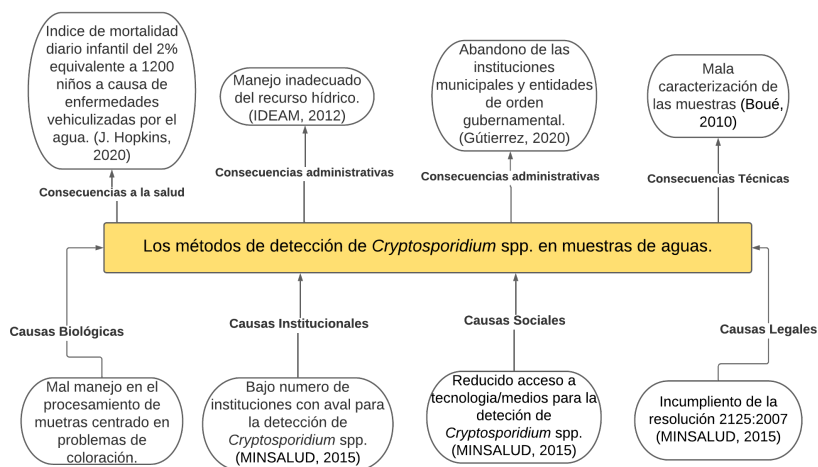


Figura 1.1: Árbol del problema

# Justificación

El primer informe realizado por el INS (Instituto Nacional de Salud) titulado, “Estado de la Vigilancia de la Calidad del Agua para Consumo humano en Colombia– 2014”, nos brindó una descripción comparada entre los índices de calidad de agua (IRCA), como evento de salud pública basado en características microbiológicas y fisicoquímicas como indicadores de presencia de microorganismos generadores de Enfermedades Vehiculizadas por el Agua (EVA), su relación a las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) y mortalidad infantil generada por estas (INS,2014). El análisis mostró como resultados una alta presencia de EVA en zonas en riesgo crítico con presencia de deterioro de la calidad del agua, en relación con los Índices de Riesgo de Calidad de Agua (IRCA) y la mortalidad de infantes en un rango de edad menor a los 5 años relacionados a EDA.



En el año 2014, de acuerdo con SIVIGILA, en Colombia fueron notificadas ciento cuarenta y nueve muertes de menores de 5 años de edad por EVA, lo cual resulta en una tasa de mortalidad de 34,5 casos por cada 10<sup>5</sup> menores. Por otro lado, en el primer informe de 2015 realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS), cuyo objetivo fue el de caracterizar el agua que es suministrada al sector doméstico, arrojó que en el 37,5 % de nuestras analizadas tenían presencia de coliformes totales, mientras que un 26,01 % de éstas contenían contaminación fecal, esto indica que el tratamiento de estas aguas no es el adecuado.(INS,2014)

Como consecuencia de estos antecedentes analizados previamente el cual nos enmarca una caracterización de la calidad de agua para consumo y uso doméstico, podemos evidenciar su relación directa con la salud y vida de los habitantes del territorio que tienen acceso a este porcentaje de agua contaminada, puesto que es el líquido vital o alimento que se ingiere y está en directo contacto con el organismo de quien lo consume; lo cual les proporciona a las entidades de orden local, regional y nacional un punto de partida para la toma de decisiones con el fin de mitigar esta problemática desde la implementación de políticas para el fortalecimiento de los sistemas de suministro de agua y sus programas de vigilancia en salud ambiental.(INS,2014)

Este microorganismo está comprometido con tres ambientes epidemiológicos:

1. Es esporádico y está relacionado con el agua y brotes de diarrea auto-limitada en personas sanas.
2. Es crónico y está asociado con una enfermedad que pone en peligro la vida en pacientes inmunocomprometidos.
3. Es causante de diarrea y desnutrición en niños jóvenes en países en vía de desarrollo.

Tomado de (Mor & Tzipori, 2008; Hashimoto et al. 2006).

La Evaluación de Riesgos realizada por el Instituto Nacional de Salud en el año 2022, demuestra que las regiones de Antioquia, Bolívar y Boyacá tienen mayor prevalencia de presencia de *Cryptosporidium* spp para aguas tratadas y no tratadas, teniendo como resultado de 176 muestras analizadas un total de positivas para presencia del microorganismo de 37 muestras equivalentes al 21 % de las analizadas en total para los años 2017 y 2018. Además de encontrarse que, la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. aislado en muestras de materia fecal de la población colombiana de diferentes regiones del país, se reportó desde el 1,7 % hasta el 83,3 % entre 1985 y 2020.(INS, 2018)

Tabla 2.1: Prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. en la población colombiana entre 1985 y 2020. Instituto Nacional de Salud (INS). Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos (ERIA) y Plaguicidas.

Ciudad/Municipio	Fecha del Estudio	Población (Años)	N	Prevalencia ( %)
Armenia	2018	4-12 años	20	10,7
Nacional	2012-2014	Población escolar	6045	0,5
Territorios insulares Oceánicos del caribe	2012-2014	Población escolar	36	3,9
Cinturón Árido pericaribeño	2012-2014	Población escolar	994	0,6
Sierra Nevada de Santa Marta	2012-2014	Población escolar	75	0
Chocó - Magdalena	2012-2014	Población escolar	1570	0,5
La Orinoquía	2012-2014	Población escolar	332	0
La Guayana	2012-2014	Población escolar	155	0
La Amazonía	2012-2014	Población escolar	104	0
Norandina	2012-2014	Población escolar	2789	0,7
Bucaramanga	Julio 2013 - Dic. 2014	<5 años	861	1,7
Popayán	Sin dato	12-54 meses	258	9,8
Amazonas	Sin dato	<15 años	284	1,9

Estos estudios muestran la necesidad de realizar su previa detección en fuentes de aguas, como lo exige actualmente la normativa colombiana, en la resolución 2115 de 2007, donde establece que se deben hacer pruebas microbiológicas para llevar un seguimiento de la calidad del agua.

En esta resolución, en el artículo 26 y 27 se reglamenta la frecuencia de análisis mínima en función de cada mil habitantes, siendo necesario conocer la cantidad encontrada por mL de muestra captada de las fuentes de abastecimiento.

Según la resolución 4716 de 2010, se establecen los procedimientos a seguir según los análisis microbiológicos en muestras de agua, con el fin de brindar una herramienta de información, gestión y control, dando los criterios para realizar un mapa de riesgo (MINSALUD, 2010). De este modo, el decreto 1575 del 2007 fija la autoridad sanitaria municipal responsable de la elaboración, revisión y actualización de los mapas de riesgo (MINAMBIENTE, 2007), que junto a la resolución 1615 del 2015 determina la cantidad de entidades certificadas a nivel nacional que prestan un servicio certificado y completo, respecto al análisis microbiológico de muestras de agua.

A partir de lo anterior nace la necesidad de diseñar un dispositivo portable que no solo cumpla con sus especificaciones técnicas, sino también su conformidad con normativas clave, como la ISO 9100 y la ISO 8112. Los estándares de calidad establecidos por estas normativas son esenciales para garantizar la eficacia y precisión de los microscopios en la proyección de imágenes.

### 2.0.1. Microscopios existentes en el mercado.

Tabla 2.2: Comparación de microscopios digitales (Parte 1)

Referencia	Aumento total	Longitud de tubo	Autonomía	Adaptación dispositivo móvil
LCD Digital Microscope, SKY BASIC 4.3	1000X	8 cm	2600mAh	NO
Celestron – LCD Digital Microscope II	240X	14 cm	5200mAh	NO
AmScope M158C-E Compound Monocular Microscope	1000X	15.8 cm	2400 mAh	SI
Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes	2500X	16.2 cm	N/A	SI

Tabla 2.3: Comparación de microscopios digitales (Parte 2)

Referencia	Peso (Kg)	Tamaño (cm)	Costo	Tomado de
LCD Digital Microscope, SKY BASIC 4.3	1.5	25.8 x 19.6 x 13.48	282,781	<b>Amazon.com:</b> LCD Digital Microscope, SKY BASIC 4.3 Inch 50X-1000X Magnification Zoom HD 2 Megapixels Compound 2600 mAh Battery USB Microscope 8 Adjustable LED Light Video Camera Microscope With 32G TF Card: Electronics, n.d.
Celestron - LCD Digital Microscope II	1.9	17.8 X 14.0 X 33.0	2,423,977	<b>Amazon.com:</b> [Research-Grade] Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes 40X-2000X Magnification With 7"LCD Screen 5MP E-Eyepiece, Two-Layer Mechanical Stage for Animal Husbandry, Pet Hospitals, Lab, Farms: Industrial & Scientific, n.d.
AmScope M158C-E Compound Monocular Microscope	18	38.3 x 25.9 x 17.5	545,440	<b>Amazon.com:</b> AMScope M158C-E Compound Monocular Microscope, WF10x and WF25x Eyepieces, 40x-1000x Magnification, Bright-field, LED Illumination, Plain Stage, 110V, Includes 0.3MP Camera and Software: Electronics, n.d.
Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes	20	50 x 31.75 x 22.86	1,603,000	<b>Amazon.com:</b> [Research-Grade] Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes 40X-2000X Magnification With 7"LCD Screen 5MP E-Eyepiece, Two-Layer Mechanical Stage for Animal Husbandry, Pet Hospitals, Lab, Farms: Industrial & Scientific, n.d.

Gracias a lo visto en la anterior tabla, es posible afirmar que los dispositivos con longitudes de tubo menores a 12,3 cm y afirmen un aumento mayor a 400x, se descartan ya que por norma ISO 9100 y la ISO 8112 los estándares de calidad no permiten que se genere una proyección correcta de la imagen en esta distancia por ende, el microscopio portable comercializado como LCD Digital Microscope, SKY BASIC 4.3 se descarta por publicidad engañosa al no tener la capacidad de generar un aumento de 1000X, por otra parte se destaca que el microscopio comercializado como Celestron – LCD Digital Microscope II, cumple con varios de los requerimientos de evaluación, sin embargo, su forma y construcción no le permiten adaptar un dispositivo móvil con cámara, a pesar de ello, se destaca que debido a sus lentes intercambiables, es posible obtener un mayor aumento y que bajo una longitud de tubo óptima le permiten visualizar con mayor detalle las características morfológicas de diferentes microorganismos, sin embargo su alto costo y poca autonomía no le permiten generar ciclos de visualización óptimos para tareas de investigación.

El Sistema para Protección y Control de la calidad del Agua, donde cuyo marco establece los índices de Riesgos de Calidad del Agua para Consumo Humano IRCA, es la instrumentalización básica con la cual se garantiza la calidad de agua potable a nivel Colombia (Decreto 1575 de 2007).

Es importante realizar este proyecto debido a que la presencia de mi-

croorganismos patógenos en estas aguas exige un cuidado más riguroso para la seguridad de la salud de los habitantes a nivel nacional que las usan. Por esto, surge la necesidad de implementar un método de detección in situ de microorganismos de menor costo, rápido y de fácil acceso que a futuro les permita a las comunidades tener una herramienta que puedan usar in situ, para determinar la presencia/ausencia de *Cryptosporidium* spp. y su cuantificación según la resolución 2115 de 2007 en el artículo 26 y 27. Esta solución también busca incorporar un enfoque interdisciplinario único que integre sistemas biológicos con herramientas de ingeniería.

Como bioingenieros, realizamos este proyecto ya que no solo apunta a mejorar la detección temprana de microorganismos peligrosos en el agua, sino que también busca ofrecer una solución práctica y asequible que beneficie directamente a las comunidades afectadas. La implementación de esta herramienta in situ podría representar un avance significativo en la prevención de enfermedades transmitidas por el agua en Colombia, reforzando así la salud pública y la calidad de vida de sus habitantes.



# Objetivos

## 3.1. Objetivo general

Desarrollo de un dispositivo portable para la identificación y cuantificación a escala de laboratorio de *Cryptosporidium* spp. en muestras de aguas usando técnicas de visión artificial.

## 3.2. Objetivos específicos

1. Construir un dispositivo para la obtención de un dataSet de imágenes de *Cryptosporidium* spp.

2. Elaborar una base de datos de *Cryptosporidium* spp. usando el dispositivo con el fin de procesar muestras de agua.
3. Desarrollar un algoritmo de identificación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. usando técnicas de visión artificial.
4. Evaluar el desempeño del sistema centrado en la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. por medio de comparación con la prueba Gold standard.

# Marco referencial

## 4.1. Patología del *Cryptosporidium* spp.

### 4.1.1. Patología

La criptosporidiosis es una enfermedad diarreica (zoonótica) de intensidad y duración variables en función de factores inherentes al hospedador, como la edad o el estado inmunológico, es causada por el parásito *Cryptosporidium*, el cual infecta al intestino. Puede producirse en el ser humano, en diferentes animales de granja, mascotas y animales silvestres. Se subestima su papel y poco se conoce sobre su epidemiología, debido al escaso interés que suscita y a la limitada disponibilidad de

métodos de diagnóstico (Hernández, 2018).

La población principalmente afectada por el microorganismo es la de humanos inmunocomprometidos, especialmente pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y niños menores de 5 años que presentan desnutrición. El cuadro clínico de estas personas es de diarrea profusa y voluminosa, fiebre, pérdida de peso y vómito (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

La infección se presenta en 2 formas diferentes según el estado inmunológico del infectado. En las personas inmunocompetentes, el período de incubación varía de 3 a 12 días pero el cuadro clínico no es confiable para hacer el diagnóstico. En algunos casos puede ser una ligera indigestión, en otros se puede presentar un cuadro de gastroenteritis con diarrea aguda o crónica, con 5 a 10 episodios diarreicos al día, generalmente acuosa pero con moco. La diarrea puede ir seguida de constipación, la mayoría de los pacientes se quejan de dolores abdominales, ocasionalmente fiebre, cefalea, anorexia, náuseas, vómito y pérdida de peso. El quiste puede encontrarse en el vómito. Generalmente la enfermedad se autolimita en 10 a 14 días, pudiendo alcanzar 18 días o persistir durante más de un mes en una cuarta parte de los pacientes (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

### 4.1.2. Taxonomía

El género *Cryptosporidium* se identificó taxonómicamente como coccidio de hábitat extracelular, protozoo del tipo apicomplexa, clase sporozoa, subclase coccidia, orden eucoccidiida, suborden eimeriina, familia *Cryptosporidiidae*, género *Cryptosporidium* (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

Aunque sus ciclos de vida son similares, existen varias características que distinguen a *Cryptosporidium* de otras coccidias: especificidad relativa del hospedador, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular y extracitoplasmática en las células hospedadoras y resistencia al parasitismo (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

### 4.1.3. Morfología

#### Partes

- La pared ooquistica: Formada por 1-2 capas.
- Esporoquistes: Elementos ovoides que encierran en su interior un número variable de esporozoitos.

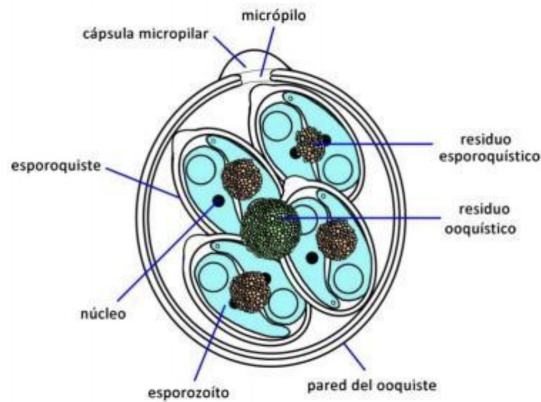


Figura 4.1: Esquema de un Ooquiste esporulado. Tomado de (La Parte-Pérez María Antonia, 2016)

- **Micrópilo:** Pequeña abertura o zona de menor resistencia por donde salen los esporoquistes o esporozoitos, suele tener una cápsula micopilar.
- Dentro del ooquiste pueden encontrarse otros elementos, como el cuerpo polar.
- Cuerpo residual esporoquístico y cuerpo residual ooquístico, resultado de las sucesivas divisiones habidas durante la formación del ooquiste.

El ooquiste tiene una cubierta externa que consta de una o dos capas lipídicas que protegen a los esporoquistes, los cuales contienen el material genético y otros organelos asociados a la reproducción. En algunos

casos se logra identificar un núcleo en cada esporoquiste. Los ooquistes presentan tamaños variados, pero en promedio al microscopio con objetivos de 10X o 40X se pueden observar microorganismos de 4 a 20  $\mu\text{m}$ , sin necesidad de tinción ((La Parte-Pérez María Antonia, 2016)).

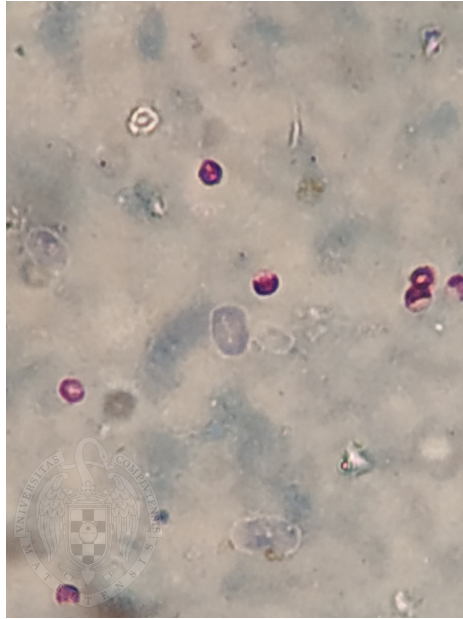


Figura 4.2: Visualización por métodos de microscopia del *Cryptosporidium* spp. con tinción de Zielh Neelsen.(La Parte-Pérez María Antonia, 2016)

El microorganismo en términos generales tiene una morfología específica. Este género cuenta con un grosor de pared oquística caracterizada por su doble o triple capa. También cuenta con esporoquistes que son el elemento infeccioso, de forma ovalada o elíptica, de un tamaño

entre los 30 a 50  $\mu\text{m}$  (Hernández, 2018).

*Elemento infectante:* El ooquiste es esférico u ovoide. Mide entre 4,5 y 5,9  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene en su interior 4 esporozoítos periféricos y un cuerpo residual central. El ooquiste presenta una pared que puede ser fina o gruesa, lo cual se relaciona con diferentes vías de desarrollo esporogónico y de infección. La pared está compuesta por tres capas visibles al microscopio electrónico y presenta una línea de sutura por donde emergen los esporozoítos. La capa externa, de 5 nm de espesor, presenta abundante material filamentosos y glicoproteínas ácidas; puede ser parcialmente eliminada por efecto del hipoclorito de sodio. Está separada por 5 nm de distancia de una capa central rígida y electrodensa, de 10 nm de espesor, de composición lipídica y glicoproteica, lo que le confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia. La capa interna, de composición glicoproteica, presenta 20 nm de espesor. Ésta provee a la pared cierta rigidez y a la vez elasticidad. Una característica única que distingue al género es la presencia de una línea de sutura en la pared del ooquiste, la cual durante el desenquistamiento permite la salida de los esporozoítos (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

*Ciclo evolutivo:* Es monoxeno y similar al de los otros coccidios entéricos con las fases de merogonia, gametogonia y esporogonia (La Parte-Pérez María Antonia, 2016).



*Ruta infecciosa:* Entra por ingestión de alimentos o líquidos con presencia del microorganismo, llegando al intestino y fijándose en el último tercio del yeyuno y el íleon, afectando las microvellosidades de las células epiteliales intestinales, absorbiendo nutrientes y destruyendo la estructura de las células generando SDA (Síndrome de Diarrea Aguda) (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition, 2020).

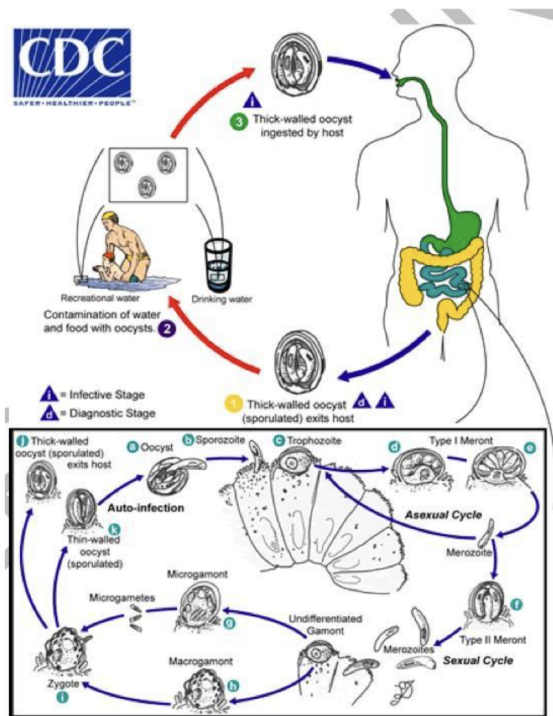


Figura 4.3: Ciclo de vida *Cryptosporidium* spp. (INS 2018)

#### **4.1.4. Métodos de identificación del *Cryptosporidium* spp.**

Para la identificación de *Cryptosporidium* spp. en el laboratorio se usa la técnica gold estándar protocolo EPA 1623.1 para la determinación de Giardia y *Cryptosporidium* en muestras de aguas:

1. Filtración
2. Elución
3. Concentración
4. Separación inmunomagnética
5. Detección y confirmación.

Para la identificación de *Cryptosporidium* spp. en el laboratorio se usa el siguiente Método manual llamado Tinción de Ziehl Neelsen (ZN) (La Parte-Pérez María Antonia, 2016):

1. Realizar un frotis bacteriano de la cepa y fijar la extensión a temperatura ambiente.
2. Calentar la muestra.
3. Cubrir con el primer colorante: Carbofucsina.

4. Se pasa por el mechero varias veces, durante cinco minutos, sin permitir que hierva el colorante.
5. Decantar y lavar con agua destilada el exceso de colorante.
6. Decolorar con alcohol/ácido hasta que la muestra tenga un color rosado.
7. Lavar con agua destilada.
8. Teñir con el colorante azul de metileno durante un minuto.
9. Lavar con agua destilada hasta retirar el exceso de colorante.
10. Secar la extensión al aire.
11. Observar al microscopio óptico y anotar los resultados.

Los 11 pasos difieren en el tiempo ya que entre coloración y decoloración el proceso manual tiene una duración promedio de 10 minutos (Rodríguez, 2019), obteniendo como resultado muestras listas para entrar a la fase de microscopía. Este proceso de microscopía se puede hacer con un microscopio digital que usa el principio de visión artificial por medio de objetivos de un microscopio óptico, o de manera óptica manual, por medio de la técnica mundialmente usada que requiere de la destreza de una persona para saber por medio de qué movimientos y objetivos encontrar el microorganismo a evaluar (Davidson, 2018).

Método de cultivo Gegmic: El método de cultivo del género *Cryptosporidium* spp. según (GEGMIC, 2015) se divide en preparación, identificación, almacenamiento, control de esterilidad, control de funcionamiento y manipulación en el laboratorio.

1. Preparación: El medio de cultivo Agar urea de christensen se debe preparar, envasar y almacenar siguiendo estrictamente las instrucciones de los procedimientos de trabajo o en su defecto las instrucciones de los fabricantes. Como normas generales hay que tener en cuenta que existen una serie de factores que afectan negativamente el buen funcionamiento de los medios como:
  - Sobrecalentamiento de los ingredientes basales.
  - Adición de la sangre o de otros aditivos sensibles al calor por encima de 50°C.
  - Envasar menor cantidad de medio que la recomendada.
2. Identificación: Cada lote de medio o aditivo preparado se marcará en su envase (placa o tubo) de forma inequívoca según se determine en el procedimiento de trabajo de cada laboratorio. Esta marca debe permitir la identificación del tipo de medio de que se trata, del lote y de la fecha de preparación.
3. Almacenamiento: Los medios se almacenarán en las condiciones adecuadas establecidas (T° ambiente, frigorífico 2- 8°C o congelador -20°C). Como recomendación se plantea que los medios en placa deben guardarse en bolsas de plástico bien cerradas. Puede afectar negativamente:
  - Almacenar a una T° no adecuada.
  -

Alternar la T<sup>a</sup> de almacenamiento de T<sup>a</sup> ambiente a 2-8°C. - Almacenar las placas en bolsas abiertas o mal cerradas. - Cerrar la bolsa contenedora de las placas antes de que estas se hayan enfriado y gelificado apropiadamente.

4. Control de esterilidad: Tomar una muestra del 5 % de los lotes de 100 o menos placas de cultivo o cajas de petri y una muestra de 10 de los lotes de más de 100 placas. Incubar durante 48h a la T<sup>o</sup> a la que va a ser incubado en el uso con muestra clínicas y posteriormente otras 48 h a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Control del funcionamiento: Consiste en comprobar la capacidad del medio de recuperar un bajo número de los microorganismos más sensibles para los que ha sido preparado, la capacidad de inhibir un alto número de los microorganismos que deben ser inhibidos en caso de los medios selectivos y de diferenciar los microorganismos para los que ha sido diseñado en caso de los medios diferenciales. El correcto funcionamiento del medio de cultivo se controlará con cepas de referencia.
6. Manipulación en el laboratorio: Según (Nodal, 2021) los *Cryptosporidium* spp. pertenecen al grupo de riesgo 2, que quiere decir que tiene un riesgo individual moderado, y un riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede

provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

#### **4.1.5. Métodos de cultivo de *Cryptosporidium* spp.**

1. Preparación del inóculo: método semicuantitativo es el más usado, consiste en preparar un cultivo del microorganismo control en BHI e incubar 18-24 horas.
2. Siembra de los medios: método cuantitativo (de Miles y Misra), dividir la tapa de la placa con rotulador en seis porciones y rotular cada una indicando las correspondientes diluciones: 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>. Con una pipeta y punta estéril tomar 10 µl de la dilución 10<sup>-6</sup> y depositarlos en “spot” en su porción correspondiente de la placa. Con la misma punta seguir por este orden poniendo 10 µl de cada una de las diluciones, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> en sus correspondientes porciones de la placa de cultivo. Para cada medio/microorganismo, observar y registrar:
3. Cantidad de crecimiento: cuadrante al que llega el crecimiento en el método semicuantitativo o dilución en el método cuantitativo.
4. Características de las colonias (tamaño, morfología, hemólisis etc..)
5. Reacciones características en medios para identificación.

El resultado de cualquier técnica al final será el procesar una muestra por medio de una observación con el fin de identificar su presencia dadas las características biológicas, morfológicas y genéticas propias del microorganismo (Davidson, 2018). La duración de las distintas técnicas depende del tipo de microscopio que se use: Microscopio de campo oscuro, Microscopio de contraste de fases, Microscopio de polarización, Microscopios invertidos, Microscopio de fluorescencia (VIRESA, 2017). El valor de estos equipos ronda entre los 445.383 pesos y los 5 millones de pesos (Microsystem, 2021). Por lo que al ser subjetiva su duración, se tiene como referencia que la técnica más conocida de microscopía óptica normal, demora desde la fijación de la muestra en la bandeja porta objetos hasta su identificación en microorganismo desde 20µm suele ser de 30 a 40 minutos en un laboratorio universitario (Arboleda, 2021).

## **4.2. Generalidades del microscopio.**

Un microscopio es un instrumento óptico utilizado para observar objetos o seres muy pequeños, que no se pueden ver a simple vista. Su función es ampliar la imagen de la muestra y permitir una observación más detallada.

El microscopio consta de tres sistemas principales: el sistema óptico, el sistema mecánico y el sistema de iluminación. El sistema óptico está

compuesto por un conjunto de lentes y elementos que manipulan la luz para generar una imagen ampliada y nítida. Por otro lado, el sistema mecánico está formado por un conjunto de elementos que proporcionan una estructura robusta y estable al sistema óptico.

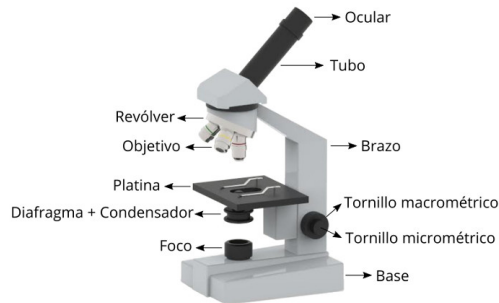


Figura 4.4: Microscopio óptico convencional

#### 4.2.1. Sistema óptico.

Consta de las siguientes partes:

- Ocular: Estos son los lentes ubicados en la parte superior del microscopio al lado del ojo del observador. Los oculares magnifican la imagen producida por las lentes, lo que permite al observador ver una imagen ampliada del espécimen.
- Objetivo: Son lentes que se colocan al lado de la muestra para



producir una imagen ampliada y nítida de la muestra. Los objetivos pueden tener diferentes aumentos y se eligen en función del tamaño y las propiedades de la muestra.

- **Revolver de objetivos:** Es un dispositivo que permite cambiar fácilmente de objetivo, para visualizar la muestra con diferentes aumentos y resoluciones.
- **Diafragma:** Es un disco con una abertura circular ubicado dentro del microscopio, cerca de la fuente de luz. Esto permite regular la cantidad de luz que llega a la muestra y, por lo tanto, ajustar el contraste y la claridad de la imagen.
- **Condensador:** Este lente se encuentra debajo del escenario y enfoca la luz en la muestra. El condensador tiene un diafragma integrado que permite ajustar la cantidad y el ángulo de la luz que incide sobre la muestra.

El sistema óptico del microscopio funciona gracias a la habilidad de las lentes para refractar la luz y enfocar en un punto. Para ello, se coloca la muestra en el escenario y se ilumina con una fuente de luz, que puede ser de diferentes tipos, como halógena o LED. La luz que atraviesa la muestra se enfoca en los objetivos y se produce una imagen ampliada e invertida en el plano focal del objetivo. Posteriormente, esta imagen ampliada se enfoca mediante los oculares y se visualiza con el ojo humano. Para controlar el contraste y la claridad de la imagen observada, se pue-

den ajustar el diafragma y el condensador para regular la cantidad y el ángulo de la luz que incide en la muestra.

#### **4.2.2. Sistema mecánico.**

Está compuesto por las siguientes partes:

- **Base:** Es la estructura que proporciona estabilidad y soporte. Esta es fabricada con materiales resistentes, suele tener forma rectangular, además contiene la fuente de iluminación.
- **Brazo:** Este es el que soporta el sistema óptico, este se extiende hacia arriba desde la base y conecta el cuerpo del microscopio con el cabezal, los oculares y los demás elementos del sistema óptico. Este también dispone de un mecanismo de anclaje de la platina y tiene un sistema de movimiento en el eje vertical controlado por los tornillos macrométrico y micrométrico.
- **Cabezal:** Está situado en la parte superior del microscopio, contiene los oculares y se conecta al brazo. Además, se puede ajustar en altura para adaptarse a la altura del usuario.
- **Platina:** Es la plataforma plana donde se coloca la muestra y se puede ajustar mediante un sistema de tornillo para cambiar la distancia horizontal entre la muestra y los objetivos.

- Pinzas: Son dispositivos que se utilizan para sujetar la muestra a la platina. Pueden ser mecánicas o de resorte y suelen tener forma de pinza o clip.
- Enfoque: es el sistema que se utiliza para ajustar la distancia entre los objetivos y la muestra y conseguir una imagen enfocada. Hay dos tipos de enfoque: enfoque grueso, que se utiliza para mover rápidamente los objetivos hacia arriba o hacia abajo, y enfoque fino, que se utiliza para ajustar la distancia con precisión.
- Los tornillos macrométrico y micrométrico: Estos controlan el movimiento de la platina en el eje vertical y permiten el enfoque de la preparación. El primero sirve para un enfoque rápido generalmente con el objetivo de menor aumento; 4X o 10X, el tornillo micrométrico permite afinar el enfoque cuando se utilizan los objetivos de mayor aumento; 40X o 100X.

El sistema mecánico del microscopio funciona gracias a los elementos que sostienen y ajustan el sistema óptico para adaptarlo a diferentes tipos de muestras. La base y el brazo sostienen la estructura del microscopio, mientras que la platina sostiene la muestra y permite su movimiento. Las pinzas sujetan la muestra en la platina y la mantienen en su lugar. El sistema de enfoque permite ajustar la distancia entre la muestra y los objetivos para lograr una imagen enfocada y nítida. La combinación de ambos sistemas, óptico y mecánico, es esencial para lograr un microscopio preciso y de alta calidad.

### **4.2.3. Sistema de iluminación.**

La iluminación del espécimen es fundamental para poder ampliar su imagen mediante el sistema óptico del microscopio. Para ello, el microscopio cuenta con una lámpara y su correspondiente transformador, ubicados en la base del aparato. La iluminación se controla mediante un interruptor y un botón regulador de intensidad. En algunos modelos de microscopio, también se incluye un diafragma de la lámpara, que permite ajustar el diámetro del haz luminoso.

Este sistema de iluminación es esencial para el funcionamiento de un microscopio óptico convencional. Gracias a él, es posible visualizar y estudiar en detalle estructuras y organismos que de otra forma serían invisibles al ojo humano.

## **4.3. Procesamiento de imágenes.**

### **4.3.1. Técnicas de filtrado.**

1. Filtros de paso bajo: El objetivo de un filtro pasa bajos, se fundamenta en suavizar la imagen, este método es útil cuando la imagen tiene gran cantidad de ruido y se quiere eliminar. Otro de los usos

es que se pueden utilizar para resaltar la información correspondiente a determinada escala. Existen varios tipos de filtros pasabajos, los más comunes son: - Filtro de la media. - Filtro de media ponderada. - Filtro de la mediana. - Filtros adaptativos. - Filtros gaussianos. Tomado de (Bermúdez 2015).

2. Filtros de paso alto: Se resaltan las zonas de mayor variabilidad, suprimiendo lo que sería la componente de la media, precisamente la que detectan los filtros de paso bajo. La respuesta de cada píxel se encuentra relacionada con el ruido de los píxeles vecinos, por medio de los filtros de paso alto se logra eliminar gran parte de la contaminación por radiación o ruido de otros medios. Para esta técnica se conocen los siguientes métodos: Sustracción de la media y filtros basados en las derivadas.
3. Filtros direccionales: Son usados comúnmente para detectar estructuras que siguen una dirección en el espacio, resaltando en sus píxeles el patrón de organización, siendo este, de norte a sur, de este a oeste.
4. Filtros para la detección de bordes: Uno de los más utilizados es el detector de bordes de Sobel que realza la variación entre filas y columnas (TELEDET, 2016)

#### **4.3.2. Preprocesamiento:**

Para el mejoramiento de las imágenes se debe hacer un pre procesamiento, donde se conocen las siguientes etapas de clasificación:

1. Dominio del espacio: La intervención elaborada se hace directamente con los píxeles de la imagen, modificando cada píxel dependiendo de su valor y el aporte de ruido de sus vecinos.
2. Dominio de la frecuencia: Se adquiere por medio de la transformada de fourier de la imagen, logrando identificar las frecuencias con mayor puntualidad y poderles brindar un mejor manejo y especificidad en el momento de intervenirlas.

Dentro de las técnicas más relevantes encontramos la modificación de escala de grises, la reducción del ruido y el realce de bordes, estas técnicas tienen un componente matemático bastante robusto (Escalera, 2017)

#### **4.3.3. Segmentación.**

La base del software de un sistema de visión artificial es la interpretación y el análisis de cada píxel. Estos cambios se realizan para facilitar

la partición de la imagen en áreas de píxeles el cual puede ser resultado final, desde la medida de una partícula, a la determinación o lectura de una serie de caracteres (OCR), pasando por cualquier otro proceso que podemos imaginar sobre las imágenes. Estos procesos cambian dependiendo de la aplicación que se les vaya a dar si es industrial o científica (Platero, 2017).

El modo RGB es aditivo y se compone de tres canales: Rojo, Verde y Azul. A través de cada uno de estos canales se proyecta una luz del color del canal, que al unirse muestra en la pantalla la imagen a todo color. En cada canal se encuentra una imagen compuesta de blancos, negros y 254 tonalidades de gris. Un píxel negro del canal rojo, indica que no dejará pasar la luz roja, es decir, no tendrá color rojo. Por el contrario, un píxel blanco dejará pasar el total de la luz roja; el resto de las tonalidades de gris, dejará pasar la cantidad que corresponda a cada color (Bermúdez 2015).

HSV es un modelo de color que tiene componentes para el tono y lo representa en color rojo o azul. El segundo parámetro que representa es la saturación que es la fuerza del color y por último, el valor o brillo, gracias ello es posible observar diferencias que canales como el RGB no permiten ver, cómo son los colores brillantes o pálidos (Bermúdez 2015).

#### **4.3.4. Transformada de Hough.**

La transformación de Hough es una técnica que se utiliza para detectar patrones en imágenes digitales. Esta tecnología se utiliza principalmente en el campo de la visión por computadora. Con la transformada de Hough, se pueden encontrar varias figuras que se pueden expresar matemáticamente, como líneas rectas, círculos o elipses (Platero, 2017).

#### **4.3.5. Representación de una imagen.**

Una imagen digital puede ser considerada como una matriz cuyos índices de fila y columna identifican un punto o lugar en el espacio bidimensional dentro de la imagen y el correspondiente valor de elemento de matriz identifica el nivel de gris en aquel punto. Los elementos de estos arreglos digitales son llamados elementos de imagen o píxeles. Es importante tener en cuenta aspectos como:

- Resolución
- Definición
- Número de planos
- Ruido



- Nitidez

Tomado de (Bermúdez, 2015).

#### **4.3.6. Reconocimiento e interpretación.**

Una vez dividida la imagen de la región de interés, los objetos presentes en el escenario deben ser cuantificados para la tarea de reconocimiento de posición. Esto consiste en asociar cada elemento segmentado con un conjunto de valores numéricos o valores de atributo. Estos valores numéricos o atributos, se llamarán vector de característica. Estos valores funcionarán como entrada al sistema de clasificación de objetos, el clasificador finalmente dará una etiqueta cualitativa aquí, es decir, el objeto presente en la imagen, cerrando así la interpretación automática de la imagen (Platero, 2017).

#### **4.4. Detección de Microorganismos por procesamiento de Imágenes.**

El uso de estos métodos de procesamiento por medio de técnicas de visión artificial se ha logrado desarrollar avances en campos investiga-

tivos como el de la universidad de sao Paulo en el 2022, gracias a una Inteligencia Artificial (IA) lograron desarrollar una aplicación móvil en un teléfono inteligente, entrenando un sistema, que por medio de morfometría, tamaño, color y características vistas en imágenes capturadas por una cámara de 12mpx adaptada a un microscopio binocular, identificaba de manera automática al homoparasito trypanosoma cruzi, logrando una precisión del 87,6 % y sensibilidad de un 90.5 %, alcanzando una detección en una escala de 0 a 1, de un 0.942, considerándose un sistema sobresaliente para detectar este parásito en muestras de sangre con métodos de tinción bajo un microscopio, uno de los grandes problemas identificados en este avance científico es que la aplicación requiere de la robustez y alto precio de un microscopio Para lograr adquirir las imágenes con el fin de procesarlas por medio del aplicativo. (labmedica, 2022)

Un método poco usado es la identificación de microorganismos por medio de procesamiento de imágenes, este método necesita de la caracterización morfológica y morfométrica de una especie, que por medio de segmentación, fija la ubicación de éstos en un proceso de barrido de las muestras, tal como lo menciona (Zarco, 2009).

A pesar de conocer que se han aplicado estas tecnologías en campos de microscopía con el fin de establecer la colonización de algún microorganismo ligado a la salud humana, el aporte de este proyecto se fundamenta en obtener por medio de técnicas de visualización artificial la presencia de coccidios en muestras de agua con el fin de prevenir su con-

sumo y propagación de este microorganismo. Se reconoce que al apoyarse en un dispositivo funcional que por medio de procesos automatizados sea capaz de obtener diferentes imágenes de una misma muestra, le da un criterio desde la ingeniería robusto. Aplicar los conocimientos de sistemas de control y análisis de imágenes les proporciona a los algoritmos de identificación y cuantificación el fundamento necesario para tener un correcto funcionamiento y el cumplimiento de sus tareas.

# Requerimientos

## 5.1. Requerimientos funcionales:

- El sistema debe contar con una interfaz de usuario que le permita iniciar el protocolo de captura de imágenes.
- El sistema debe contar con un mecanismo que permita regular de manera manual la exposición de luz y posición en x,y de la placa que contenga las muestras para la identificación del microorganismo.
- El sistema debe contar con un software que permita la identificación de *Cryptosporidium* spp., en muestras de agua.
- El sistema debe arrojar un dato numérico sobre la cantidad de

cóccidos encontrados por muestra.

- El sistema debe tener la capacidad de mover la placa porta objetos y enfocar las muestras.
- El sistema debe ser capaz de enfocar de forma manual, con precisión de movimiento de máximo 1mm.
- El sistema debe contar con un interruptor que encienda y apague la luz del portaobjetos.
- El sistema debe ser resistente a la corrosión por fluidos.
- El sistema debe usar un dispositivo móvil con cámara para capturar la imágenes.
- La aplicación debe permitir aprovechar la cámara del dispositivo de manera tal que pueda tomar fotografías de las muestras.
- La aplicación debe enviar la fotografía a un servidor en la nube para que ésta sea procesada.
- La aplicación debe contar con una pantalla que permite la previusualización de la foto a ser validada, y una pantalla para visualizar los resultados una vez el algoritmo de visión artificial haya identificado la presencia o no del microorganismo.
- Contar con un API (interfaz de programación de aplicaciones) que permite el envío de imágenes a ser procesadas.

- Contar con un API (interfaz de programación de aplicaciones) que permita obtener la respuesta del algoritmo de procesamiento de imagen.
- El sistema debe ser capaz de adquirir imágenes mediante un dispositivo móvil que cumpla con los siguientes requisitos mínimos.
  - Resolución de la cámara de al menos 12 megapíxeles.
  - Memoria RAM de al menos 4 gigabytes.
  - Dimensiones físicas del dispositivo dentro del rango de 154-165 mm de largo, 74,5-76,2 mm de ancho y 7,8-8,3 mm de profundidad.

## **5.2. Requerimientos técnicos**

- El sistema debe poder adquirir imágenes con un objetivo de 100x con una apertura de 1.25 en las muestras de aguas.
- El sistema debe contar con su propia fuente de alimentación de 5-9v DC.
- El sistema debe pesar máximo 15kg.
- El sistema debe contar con una montura RMS para un lente objetivo de 100x.

- El sistema debe medir, máximo 60 x 60 x 60 cm de alto, ancho y largo.
- Brindar un End Point o Ruta de carga donde serán enviadas las fotografías de la aplicación mobile.
- Brindar un End Point o Ruta para la consulta de las fotografías previamente tomadas que pueda ser accesible para la solución de procesamiento de visión artificial.
- El aplicativo debe ofrecerle al usuario la opción de almacenar los datos de la muestra procesada.

### **5.3. Requerimientos de restricción**

- El dispositivo debe cumplir con los protocolos establecidos en el manual de microscopia y manejo de coccidios.
- El dispositivo debe cumplir con el artículo 10 numeral b y el artículo 11 parágrafo 3 de la resolución 2115 del 2007.
- El resultado obtenido debe ser comparado con el análisis de laboratorio.
- La aplicación debe correr en un dispositivo Android con una versión de Android 10 o superior.

- La aplicación debe correr en un dispositivo iOS con una versión iOS 15 o superior.
- La aplicación debe gestionar los permisos necesarios para el adecuado uso de la cámara y galería de fotos.
- Estar disponible en internet para recibir y manejar las solicitudes de la aplicación en el momento que se desee.



# Metodología

Para llevar a cabo el desarrollo del proyecto de grado se empleó la metodología RUP (Proceso Unificado Racional), este es un enfoque ampliamente reconocido en el desarrollo de software y se destaca por su asociación con el Lenguaje Unificado de Modelado (UML). Esta metodología goza de una difusión comercial significativa y es conocida por su efectividad.

RUP es una creación de RATIONAL (IBM) y se caracteriza por su enfoque iterativo e incremental. Pone un fuerte énfasis en la arquitectura del sistema y se centra en los casos de uso. RUP incorpora artefactos, que son productos tangibles del proceso, como el modelo de casos de uso y el código fuente, entre otros. También define roles que las personas desempeñan en diferentes momentos a lo largo del proceso.

Este proyecto de grado tiene como objetivo el desarrollo de un dispositivo portable para la identificación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. usando técnicas de visión artificial en muestras de agua. Para lograr gestionar eficazmente todo el proceso de desarrollo de este, era esencial contar con una metodología que permitiera organizar las etapas del proyecto, mantener documentación básica para asegurar la continuidad y gestionar todas las variables que podrían influir en el proyecto.

La elección de RUP se basó en varias razones. En primer lugar, RUP es una metodología diseñada específicamente para el desarrollo de software, lo que garantiza un enfoque ordenado en sus fases y permite ajustar el producto de manera precisa a medida que se revisan los requerimientos. Dado que RUP considera la utilización de requerimientos como punto de partida, el proceso completo depende de ellos, lo que garantiza una alineación estrecha con los objetivos del proyecto.

Además, RUP facilita la trazabilidad de los requerimientos, lo que es fundamental para mantener un seguimiento efectivo durante el desarrollo. También simplifica el mantenimiento y la realización de posibles innovaciones o correcciones en el software desarrollado, lo que es especialmente relevante en un proyecto de implementación.

En resumen, la elección de RUP se basó en su capacidad para proporcionar una estructura organizada, un enfoque iterativo e incremental, y una gestión efectiva de los requerimientos, lo que resulta fundamental

para el éxito del presente trabajo de grado.

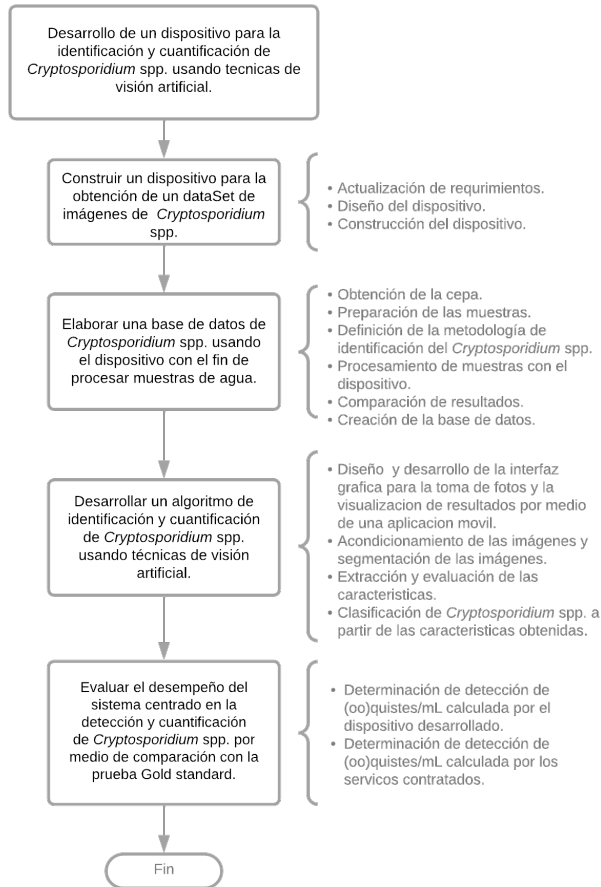


Figura 6.1: Metodología general basada en las principales 4 fases del proyecto de grado (Elaboración propia).

A continuación se detalla la estructura de la metodología basada en

sus 4 fases y el desarrollo de cada actividad para el cumplimiento de esta:

1. Fase 1: construir un dispositivo para la obtención de un dataSet de imágenes de *Cryptosporidium* spp.

- a) Definición de requerimientos para microorganismos
- b) Definición de requerimientos para el dispositivo
- c) Definición de requerimientos para el software.
- d) Priorización y ponderación de los requerimientos.
- e) Refinamiento de los requerimientos.
- f) Diseño y construcción del dispositivo.

2. Fase 2: elaborar una base de datos de *Cryptosporidium* spp. usando el dispositivo con el fin de procesar muestras de agua.

- a) Obtención de la cepa de *Cryptosporidium* spp.
- b) Preparación de las muestras.
- c) Identificación del *Cryptosporidium* spp.
- d) Protocolo de captura de imágenes del *Cryptosporidium* spp. con el dispositivo.
- e) Creación de la base fotos ordenada por medio de Python.

3. Fase 3: desarrollar un algoritmo de identificación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. usando técnicas de visión artificial.

- a) Identificación del color específico del *Cryptosporidium* spp.

- b)* Identificación de características del *Cryptosporidium* spp.
  - c)* Evaluación de la extracción de características del *Cryptosporidium* spp.
  - d)* Implementación en producción del algoritmo validado con Python anywhere.
  - e)* Desarrollo del user flow para la construcción de la app móvil.
  - f)* Diseño UX/UI de la app móvil.
  - g)* Desarrollo de la app móvil en Flutter.
4. Fase 4: evaluar el desempeño del sistema centrado en la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. por medio de comparación con la prueba Gold standard.
- a)* Matriz de confusión.
  - b)* Determinación de detección de (oo)quistes/mL calculada por el dispositivo desarrollado.
  - c)* Determinación de detección de (oo)quistes/mL calculada por los servicios contratados.

**Fase 1: construir un dispositivo para la obtención de un dataSet de imágenes de *Cryptosporidium* spp.:**

- a)* Definición de requerimientos para el microorganismo:

Con la finalidad de definir los requerimientos para el microorganismo, fueron tomadas en consideración las características medioambientales y de manipulación, que fueron planteadas en: 1) la guía para la vigilancia por laboratorio de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua dada por el INS (INS, 2018).

2) la guía de manipulación de *Cryptosporidium* spp. en el Standard Method 1623 de la EPA, 2005.

3) el Standard Method 9711 del 2017.

Estas, establecen los lineamientos mínimos de seguridad, metodologías de identificación por microscopía y las características morfológicas más relevantes para la visualización de *Cryptosporidium* spp. en diferentes medios de análisis además se encuentran valores de referencia de tamaño mínimo y morfología estudiada por microscopía del microorganismo junto a la manera correcta de manipularlo.

*b) Definición de requerimientos para el dispositivo:*

En estos requerimientos se definieron las características, físicas, eléctricas, de diseño y funcionamiento que componen los subsistemas del dispositivo con el fin de lograr el cumplimiento de los requisitos del apartado para la visualización del *Cryptosporidium* spp., las definiciones específicas del dispositivo se desarrollaron siguiendo los estándares de la

guía de microscopía del standard Method 9711 del 2017, en conjunto con el SM 1623 de la EPA, el cálculo y la toma de decisiones se basa en la norma ISO 9345 del 2019 en donde se especifica los requisitos mínimos de construcción de un dispositivo de aumento con la capacidad resolutive de 0,2 micrometro, seleccionando un complejo de lentes y mecanismos que le permitan un correcto funcionamiento, asegurando un sistema de iluminación y enfoque que cumplan con los estándares de construcción de las normas ISO 8255-1 del 2017 y la Iso 9345 del 2019.

*c) Definición de requerimientos para el software de identificación del microorganismo*

Para definir los requerimientos del software se baso en la guía del desarrollo de software a la medida (Guía de desarrollo de software a medida - Evaluando software, s. f.) y metodologías de desarrollo de software (MAIDA & GABRIEL, s. f.) para esto se definieron 2 etapas:

- Diseño de una aplicación móvil para la captura de las imágenes y visualización de resultados usando un dispositivo móvil con cámara. - El desarrollo de un algoritmo que tenga la capacidad de identificar *Cryptosporidium* spp. por medio de técnicas de visión artificial.

Para esto se tuvo en cuenta el pre procesado y el procesado de las imágenes obtenidas por un dispositivo móvil con cámara, definiendo como etapa de pre procesado el mejoramiento y definición de resoluciones

mínimas que tengan la tecnología de adquisición de las imágenes, en conjunto con la capacidad resolutive, obturación y selección de imágenes que cumplan con los requerimientos de la etapa de procesamiento, en donde se establece la ruta de identificación que parte de las características morfométricas y morfológicas observables por medio de una imagen, teniendo en cuenta que como resultado de este estudio se obtiene una identificación y cuantificación del microorganismo en muestras manipuladas y observadas con el resultado del dispositivo portable.

Como parte fundamental del desarrollo de este apartado se tiene en cuenta los resultados esperados en las guías de laboratorio y manipulación de *Cryptosporidium* spp. como lo son el SM-1623 de la EPA, 2005 y el SM- 9711 del 2017.

#### *d) Priorización y ponderación de los requerimientos*

- Para la correcta ejecución de esta parte del proceso, se definió una escala de evaluación (véase figura 6.2), usando una matriz QFD en la cual se definen 8 necesidades. Posteriormente cada requerimiento es evaluado con respecto a cada necesidad, que da como resultado una tabla de priorización de requerimientos según la ponderación obtenida, a mayor puntaje, mayor peso del requerimiento, y a partir de esto, se le asignó a cada requerimiento un nivel de prioridad, siendo 1 el de mayor importancia y 9 el de menor importancia.



Escala para evaluar				
1	2	3	4	5
No tiene ninguna relación con el requerimiento	Tiene poca relación con el requerimiento	Tiene relación con el requerimiento	Tiene una alta relación con el requerimiento	Depende directamente del requerimiento

Figura 6.2: Escala de evaluación de los requerimientos (Elaboración propia).

#### *e) Refinamiento de los requerimientos*

Una vez completada la priorización y ponderación de los requerimientos, se debe efectuar un proceso de evaluación de los diferentes sistemas a implementar que den paso a la construcción del dispositivo. Primero se definió la escala de evaluación de criterios para los 3 sistemas como se ve en la figura 6.2:

- Elección del material de la estructura principal.
- Sistema de enfoque.
- Sistema de iluminación.

Escala para evaluar los criterios					
0	1	2	3	4	5
No cumple el criterio	No está relacionado con ningún requerimiento	Está relacionado con 1 requerimiento de nivel 7,8 o 9	Está relacionado con 1 requerimiento de nivel 4,5 o 6	Está relacionado con 1 requerimiento de nivel 1,2 o 3	Está relacionado con más de 1 requerimiento

Figura 6.3: Escala de evaluación de los criterios (Elaboración propia).

Luego se realiza una evaluación de cada criterio definido para cada sistema, haciendo una relación con los requerimientos y el nivel de prioridad de cada uno, a partir de esto se le asigna un peso a cada criterio dependiendo de la relación con el requerimiento, según se observa en la figura 6.3. Una vez cada criterio tiene un valor asignado, se procede a realizar la evaluación de la elección del material de la estructura principal y de los sistemas de enfoque e iluminación, al final se asigna un puntaje por cada material y sistema de enfoque e iluminación. Esto nos permite escoger los materiales para la construcción del dispositivo y la elección de los sistemas de enfoque e iluminación que cumplen con los criterios establecidos.

#### *f) Diseño y construcción del dispositivo*

**Diseño conceptual:** después de llevar a cabo el proceso de identificación y actualización de requerimientos, según las guías de laboratorio y manipulación de *Cryptosporidium* spp., como el SM-1623 de la EPA en 2005 y el SM-9711 de 2017, se procede a realizar la fase de diseño.

En esta etapa de diseño conceptual se divide en una fase de planificación o contextualización, en la que se realiza un levantamiento de requerimientos. Posteriormente, estos se evalúan y se estandarizan en una matriz QFD (Despliegue de la Función de Calidad), lo que da como resultado un método para la toma de decisiones que respalda el proceso de iteración y rediseño.

Este proceso de actualización se inició estableciendo los parámetros de funcionamiento necesarios para un dispositivo de microscopía, el cual es esencial para llevar a cabo la identificación morfológica del microorganismo *Cryptosporidium* spp. Además, estos parámetros proporcionan las herramientas necesarias para que un software de visión artificial pueda identificar el microorganismo a través de un dispositivo móvil equipado con cámara.

En el contexto de la evaluación, se utiliza el software de diseño Fusion 360 de Autodesk para crear una representación digital de los sistemas integrados que cumplen con los requerimientos establecidos. Se definen características como el tamaño, peso, la forma de interacción y el acoplamiento con otros sistemas. Se diseñan en total tres sistemas de iluminación, y se evalúa cuál de ellos cumple mejor con los criterios derivados de cada requerimiento, teniendo en cuenta la siguiente metodología de evaluación.

Según la tabla 6.3 se lleva a cabo una evaluación del sistema de enfo-

que, que se considera el pilar central en la estrategia y análisis de nuestro proceso de diseño. Se definen cuatro mecanismos con sistemas de enfoque distintos, lo que da lugar a un proceso de iteración desde el punto de vista de ingeniería. Desde un principio de funcionamiento manual, se derivan diferentes configuraciones, orientadas a garantizar el cumplimiento de los requerimientos de la manera más efectiva.

Este sistema se basa en la utilización de un objetivo y un ocular, que mediante su capacidad de aumento, permiten la visualización del microorganismo. Esto se logra a través de la aplicación de la siguiente ecuación que calcula la longitud focal necesaria, como se muestra a continuación:

Calculo de la longitud focal: 
$$F_{\text{obj}} = \frac{L_{\text{tube}}}{M_{\text{obj}}}$$

$F_{\text{obj}}$  : Aumento del ocular.

$L_{\text{tube}}$  : Longitud del tubo.

$M_{\text{obj}}$  : Aumento lineal del objetivo.

El uso de la ecuación del calculo de la longitud focal debe ir acompañado de una evaluación detallada de la combinación óptima de lentes que conforman el sistema de enfoque. Según el SM-9711 de 2017, que establece el tamaño promedio del microorganismo en un rango de 0.2 a 0.8 micrómetros, se requiere una combinación de lentes que defina una

resolución estándar específica a través del aumento, con el propósito de permitir la observación del microorganismo. La figura 6.4 proporciona una guía para la selección adecuada de ambos lentes, sirviendo como un instructivo esencial en este proceso.

		Ocular			
		10x	12x	15x	20x
Objetivo	2x (0.06)	20x	24x	30x	40x
	4x (0.1)	40x	48x	60x	80x
	10x (0.25)	100x	120x	150x	200x
	20x (0.4)	200x	240x	300x	400x
	40x (0.65)	400x	480x	600x	800x
	60x (0.75)	600x	720x	900x	1200x
	100x (1.25)	1000x	1200x	1500x	2000x

Figura 6.4: Tabla de Aumentos entre el complejo de lentes según su conjugación (Diez, 2020).

Una vez que se han identificado las características que deben cumplir cada sistema y se ha elaborado un diseño digital, se avanza hacia la evaluación de prototipos a escala. En este proceso, se aplican los requisitos de construcción y se lleva a cabo una exhaustiva evaluación de materiales con el objetivo de determinar cuál es la mejor solución para cada sistema.

Durante esta fase de evaluación de prototipos, se detectan los problemas y áreas de mejora específicas para cada sistema. Estas mejoras se aplican sistemáticamente con el propósito de perfeccionar el diseño y alcanzar la versión final del producto.

**Fase 2: elaborar una base de datos de *Cryptosporidium* spp. usando el dispositivo con el fin de procesar muestras de agua.**

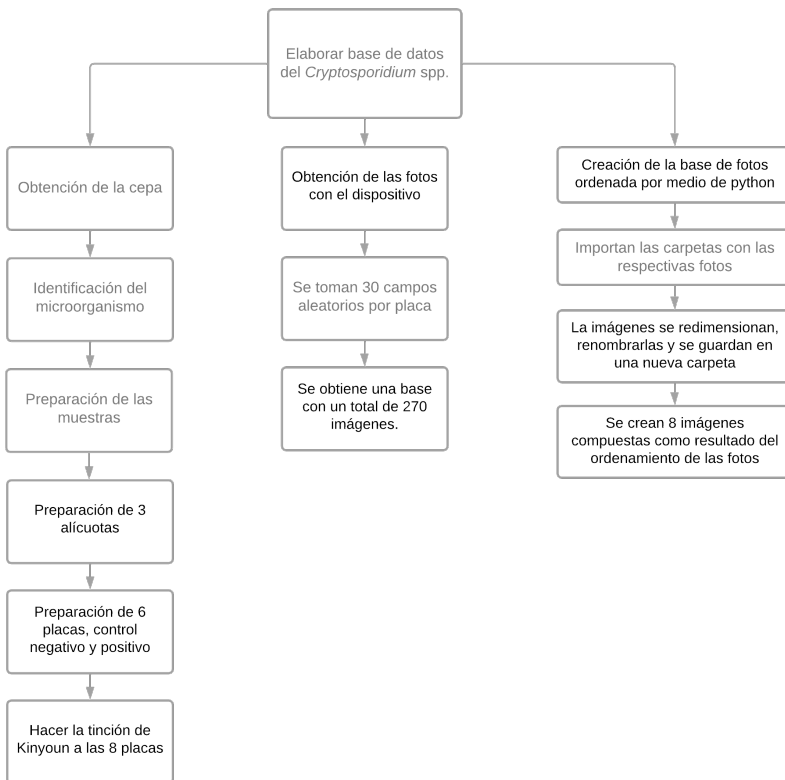


Figura 6.5: Metodología objetivo 2 (Elaboración propia).

*a) Obtención de la cepa de Cryptosporidium spp.*

Se estableció contacto con el grupo de investigación denominado Unidad de Investigaciones Agropecuarias con el propósito de obtener una muestra de *Cryptosporidium* spp. Se recibieron 2 microlitros de la muestra líquida para procesar en el laboratorio. Además, se proporcionó una lámina de laboratorio positiva ya teñida con la tinción de Ziehl Neelsen que contenía *Cryptosporidium* spp. Se recibió capacitación sobre cómo identificar y replicar la muestra.

*b) Preparación de las muestras.*

Debido a la resistencia notable de este microorganismo a los métodos tradicionales de desinfección y sanitización, como la filtración a través de materiales granulares, es esencial considerar ciertas características al analizar las muestras en el laboratorio. En este contexto, definimos el pH como la medida del potencial de hidrógeno presente en la muestra, lo cual se relaciona con la acidez o alcalinidad del agua destinada al consumo humano, en la que *Cryptosporidium* spp. puede encontrarse suspendido. Además, definimos la turbidez como la cantidad de solutos o partículas suspendidas en el agua, una característica que guarda una estrecha relación con la presencia de componentes tóxicos o microorganismos peligrosos en la muestra, como *Cryptosporidium* spp. La conductividad, por otro lado, se presenta como una característica esencial en la evaluación de la calidad del agua potable, ya que está vinculada a la

cantidad de iones suspendidos en el agua y puede indicar la existencia de excesos que podrían representar riesgos para la salud.

Para llevar a cabo esta caracterización, decidimos recolectar muestras de agua de procesos de filtración que utilizan 2 etapas, ya que estos son los más comunes en territorios rurales, según un artículo publicado en el periódico El Tiempo (Álvarez, 2023). Estos procesos nos proporcionan la calidad de agua necesaria para llevar a cabo nuestras pruebas y evaluar la concentración de (oo)quistes presentes. Para garantizar que el proceso de filtración esté funcionando de manera óptima, es necesario cumplir con los siguientes requisitos:

- Adquirir las muestras de un filtro de 2 etapas, donde la primera etapa debe consistir en materiales granulados y contener al menos 3 tipos de materiales. En nuestro caso, utilizamos un cartucho con fases de carbón activado, poliéster y cerámica, con un tiempo de uso máximo de 3 meses.
- Asegurarse de que el proceso de filtración esté respaldado por una etapa de luz UV.

Siguiendo estos parámetros, podemos confiar en la eficacia del proceso de filtración y obtener resultados confiables en nuestras pruebas de calidad de agua y concentración de *Cryptosporidium* spp. en las muestras.



De acuerdo a las recomendaciones de (Darío Marín, 2019), las medidas ideales para estas características son las siguientes:

- pH: 7-8.5
- Turbidez: 0-5 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU)
- Conductividad: 850-1500 microsiemens por centímetro ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )

Estableciendo la siguiente metodología para la recolección y análisis de las características anteriormente mencionadas tomadas del Standard Methods en su volumen 23, siendo usadas para la medición del Ph, el SM 2310 y el SM 2320 , para la turbidez se usa el SM 2130 y conductividad el SM 2510(Standard methods for the examination of water and wastewater, 2017), estableciendo los siguientes diagramas metodológicos:



Figura 6.6: Implementación del SM 2310 para la recolección de datos de pH y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia).



Figura 6.7: Implementación del SM 2130 para la recolección de datos de turbidez y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia).

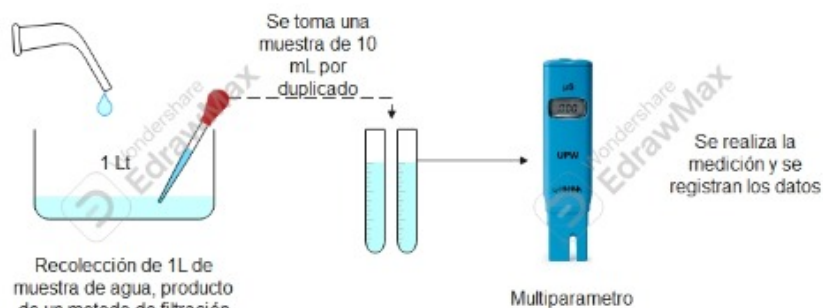


Figura 6.8: Implementación del SM 2510 para la recolección de datos de conductividad y caracterización de las muestras obtenidas (Elaboración propia).

Para la identificación se establece bajo el manual de microscopía y la SM 1623.1 un proceso de dilución, escogiendo 3 concentraciones, con el fin de acoger la metodología empleada en el análisis de las Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual (Arnedo, 2008), posterior a ello es necesario preparar las 3 diluciones por medio de una muestra patrón comercial que brinde la información de concentración estimada según el medio en el que se encuentre, estableciendo una dilución de 9 mL de agua filtrada ya caracterizada por la metodología de preparación de muestras y 1 mL de muestra patrón para la concentración 1, estableciendo así la concentración de  $10^{-1}$ , de manera similar se establece una dilución de 10 mL de agua filtrada ya caracterizada y 0,1 mL de la concentración de  $10^{-1}$ , definiendo una concentración de  $10^{-3}$ , por último, para la última dilución se establece la combinación en los tubos de ensayo de 20 mL, 9 mL de agua y 1 mL de muestra de la concentración de  $10^{-3}$ , estableciendo una concentración de  $10^{-5}$ , el consolidado de este proceso se establece por duplicado con el fin de tener la mitad de los tubos con muestras de agua filtrada para procesar con el dispositivo de bajo costo y la otra mitad con muestras que harán parte de la evaluación que se hará por el laboratorio contratado. Este proceso se consolida en la siguiente figura.

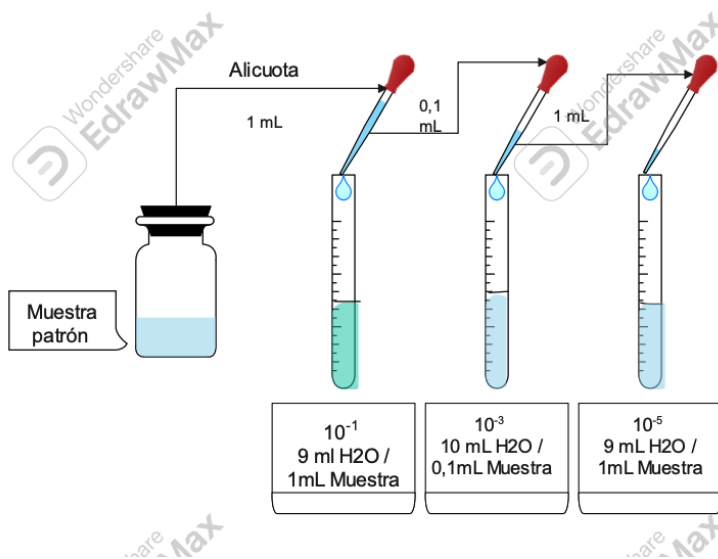


Figura 6.9: Preparación de los concentrados con la muestra patrón (Elaboración propia).

El proceso se debe hacer para los tubos que llevan muestra, siendo estos los M2-10<sup>-1</sup>, M3-10<sup>-3</sup> y M4-10<sup>-4</sup>, dejando al M1-10 como control negativo.

Gracias a ello, es posible establecer por la siguiente fórmula la concentración estimada de (oo)quistes/mL para la primera muestra, posterior a ello es posible conocer por el factor de dilución la cantidad de (oo)quistes/mL teórica que se encontrarán en las otras muestras.

Calculo de concentración:  $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$C1$  : Concentración de la solución 1,

$V1$  : Volumen de la solución 1,

$C2$  : Concentración de la solución 2,

$V2$  : Volumen de la solución 2,

Tomada de (Arnedo, 2008).

*c) Identificación del microorganismo:*

Después de preparar las muestras se procede a realizar la identificación de *Cryptosporidium* spp. definimos el proceso de tinción de las muestras, estableciendo según la SM 1623.1 y el manual de microscopia (INS,2014) la aplicación de la tinción de Kinyoun o Ziehl Neelsen modificada en las laminas elaboradas por duplicado por cada concentración.

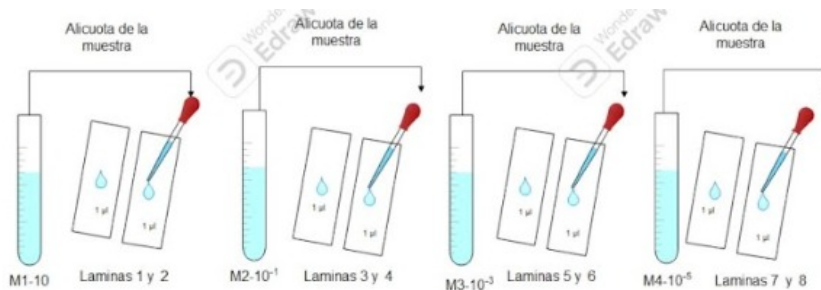


Figura 6.10: Preparación de las muestras en las láminas para el proceso de tinción y (Elaboración propia).

Para la tinción es necesario notar la explicación dada en el anterior figura, tomando una alícuota de 0,1  $\mu$ L de cada concentración y fijarla por calor a las laminas portaobjetos, posterior a ello, se procede a seguir los siguientes pasos:

- Etiquetar o identificar el portaobjetos.
- Tomar una porción pequeña de la muestra (0,1 mL) con ayuda de un aplicador o una micropipeta.
- Hacer una extensión fina sobre el portaobjetos.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Una vez seca, fijar la extensión con METANOL o bien aplicando calor con ayuda de un mechero (pasar el portaobjetos 2-3 veces sobre la llama de forma rápida para evitar que la muestra se queme) y dejar enfriar.
- Cubrir la preparación con el reactivo FUCSINA FENICADA durante 5 minutos (toda la muestra quedará teñida de color rojo intenso).
- Decolorar con ALCOHOL-ÁCIDO durante 20-30 segundos (los quistes AAR de estos parásitos intestinales no se decoloran, permaneciendo de color rojo-fucsia).
- Lavar con AGUA.

- Cubrir la preparación con el reactivo AZUL DE METILENO durante 30 segundos.
- Lavar con AGUA.
- Secar la preparación y visualizar en el microscopio con el objetivo 100x (aceite de inmersión). (JUAN CARLOS REY, 2012)

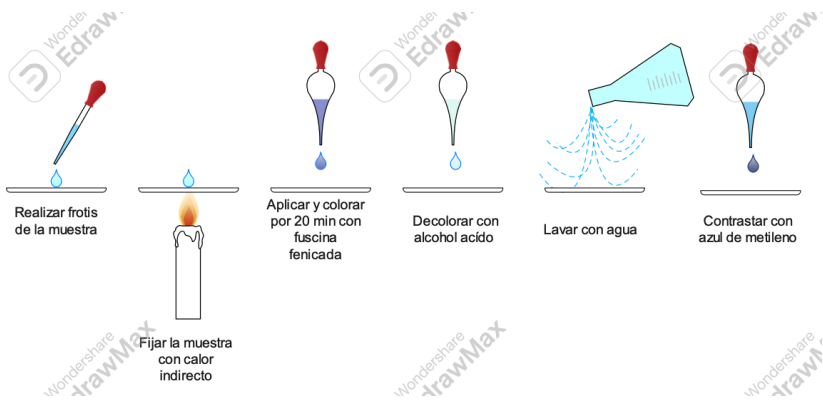


Figura 6.11: Tinción de Ziehl Neelsen (Elaboración propia).

*d) Protocolo de captura de imágenes del Cryptosporidium spp. con el dispositivo:*

Al tener como resultado las laminas con las muestras sometidas a una tinción, se procede a realizar una visualización de estas usando el dispositivo desarrollado en el objetivo 1 con una apertura de 1.25 y un lente objetivo de 100x. La cantidad de campos establecida para observar la lamina es de 30 campos aleatorios por lamina con un campo de visión de

0.8 mm y un total de muestra procesada de 4 mL por concentración preparada teniendo en cuenta el SM 9711, obteniendo una base total de 270 imágenes del microorganismo *Cryptosporidium* spp. (Arnedo, 2008).

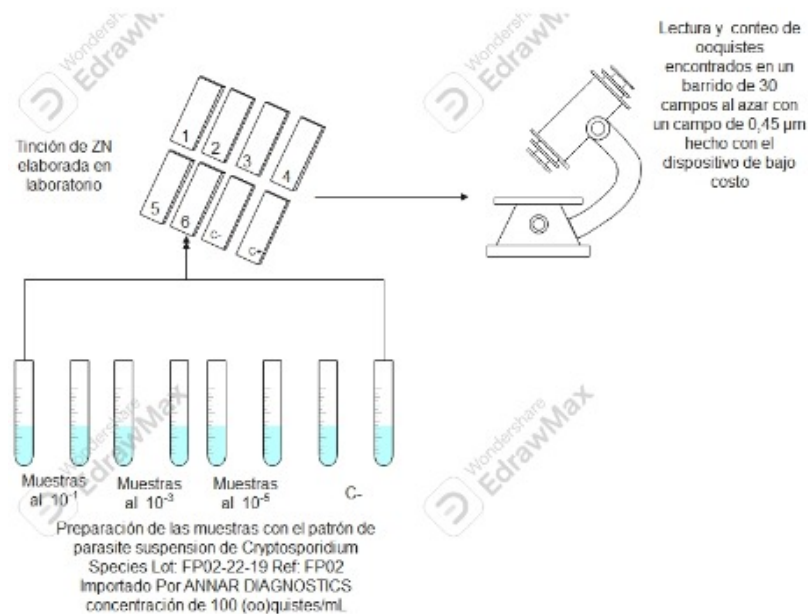


Figura 6.12: Procesamiento y observación de las laminas con tinción (Elaboración propia).

Tal como se ve en la anterior figura, por concentración, se obtienen 2 láminas, junto al control positivo y negativo, para llevar con mayor seguridad y adherencia de la SM 1623.1, se procesan las imágenes en el dispositivo, obteniendo 30 fotografías por cada lámina procesada, esto con el fin de crear la base de datos de la que se hará la extracción y reconocimiento de las características de evaluación para su identificación



por métodos de visión artificial.

*e) Creación de la base de fotos ordenada por medio de Python:*

En la conceptualización y desarrollo de sistemas complejos, la adopción de metodologías claras y robustas se erige como un pilar fundamental para asegurar la comprensión, organización y mantenibilidad del código. En este contexto, hemos optado por emplear dos herramientas visuales clave: un diagrama de clases y un diagrama de flujo. El diagrama de clases actúa como un mapa detallado que ilustra la estructura estática del código, proporcionando una visión integral de las clases, sus atributos y métodos, así como las relaciones entre ellas. Esta representación visual no solo simplifica la comprensión del código, sino que también fomenta una implementación más organizada y modular. Complementando esta visión estática, el diagrama de flujo detalla de manera secuencial y clara el funcionamiento operativo del sistema. Desde la inicialización de variables hasta la creación de imágenes compuestas, este diagrama ofrece una guía visual concisa del flujo de ejecución, facilitando una comprensión holística de la metodología implementada. En conjunto, estas representaciones visuales constituyen una metodología concisa y robusta que fortalece la comprensión y mantenibilidad del sistema.

## **Diagrama de Clases:**

### **1. Clase ImageProcessor**

**Descripción:** Encargada del procesamiento de imágenes.

**Atributos:** Ninguno.

**Métodos:**

- `load_image(image_path: str):` Carga una imagen desde la ruta proporcionada y la devuelve como un objeto de la clase `Image`.
- `resize_image(image: Image, width: int, height: int):` Redimensiona una imagen (`Image`) a las dimensiones especificadas.
- `save_image(image: Image, save_path: str):` Guarda una imagen (`Image`) en la ruta de archivo proporcionada.

## 2. Clase `ImageFolder`

**Descripción:** Representa una carpeta que contiene imágenes.

**Atributos:**

- `folder_path:` La ruta de la carpeta que contiene las imágenes.

- `unique_images`: Un conjunto que mantiene un registro de imágenes únicas para evitar duplicados.
- `images`: Una lista de objetos de la clase `Image`.

### **Métodos:**

- `__init__(folder_path: str)`: Constructor para inicializar la carpeta con una ruta.
- `load_images()`: Carga todas las imágenes de la carpeta.
- `process_images(processor: ImageProcessor, new_folder_path: str, new_width: int, new_height: int)`: Procesa las imágenes (carga, redimensiona y guarda) utilizando un `ImageProcessor` y las guarda en una nueva carpeta con dimensiones especificadas.
- `create_composite_image(num_rows: int, num_columns: int, title: str, composite_path: str)`: Crea una imagen compuesta a partir de las imágenes en la carpeta.

### **3. Clase Image**

**Descripción:** Representa una imagen individual.

### **Atributos:**

- `path`: La ruta del archivo de la imagen.
- `data`: Los datos de la imagen representados como un arreglo NumPy.

### **Métodos:**

- `get_data()` : Devuelve los datos de la imagen.

**Resumen del Diagrama de Clases:** Este diagrama propone una estructura más orientada a objetos para el procesamiento de imágenes. Las clases tienen responsabilidades bien definidas, como cargar, redimensionar y guardar imágenes, gestionar carpetas de imágenes y mantener registros de imágenes únicas. Esta estructura facilita la organización y reutilización del código, haciendo que el sistema sea más modular y mantenible.

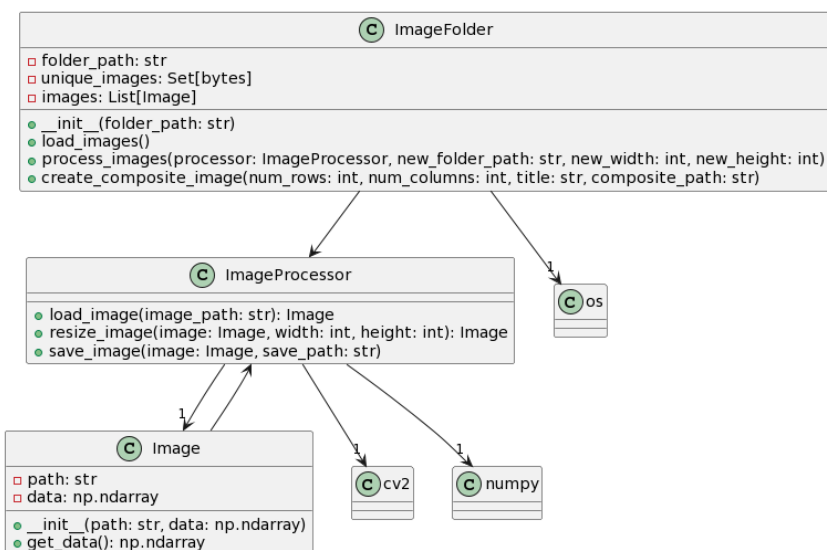


Figura 6.13: Diagrama de clases ordenamiento de la base de datos (Elaboración propia).

## Diagrama de Flujo:

### 1. Inicialización y Directorios

- Se establecen directorios de entrada y salida.
- Se define el tamaño de redimensionamiento de las imágenes (500x500 píxeles).

### 2. Inicialización de Variables

- `matriz_indexada`: Almacena información sobre las imágenes

en cada carpeta. - `imagenes_unicas`: Conjunto para llevar un registro de las imágenes únicas.

### **3. Recorrido de Carpetas**

- Se recorren las 8 subcarpetas del directorio raíz. - Se crea una nueva carpeta llamada `Generales_pdg_final` y se realiza una copia de las subcarpetas y sus archivos.

### **4. Procesamiento de Imágenes**

- Para cada imagen:

1. Identificación del tipo de archivo y conversión si es necesario.
2. Verificación de imágenes únicas.
3. Redimensionamiento a 500x500 píxeles y renombrado.
4. Guardado en la nueva carpeta en subcarpetas respectivas.

### **5. Creación de Imágenes Compuestas**

- Se crean 8 imágenes compuestas en una matriz de 5x6. - Se guardan en la carpeta `Generales_pdg_final`.

**Resumen del Diagrama de Flujo:** Este diagrama describe el proceso de creación de la base de datos, desde la inicialización de variables hasta la creación de imágenes compuestas. Cada paso se detalla, incluyendo la verificación de imágenes únicas y el procesamiento de cada imagen. La estructura del flujo facilita la comprensión del proceso de manera secuencial.

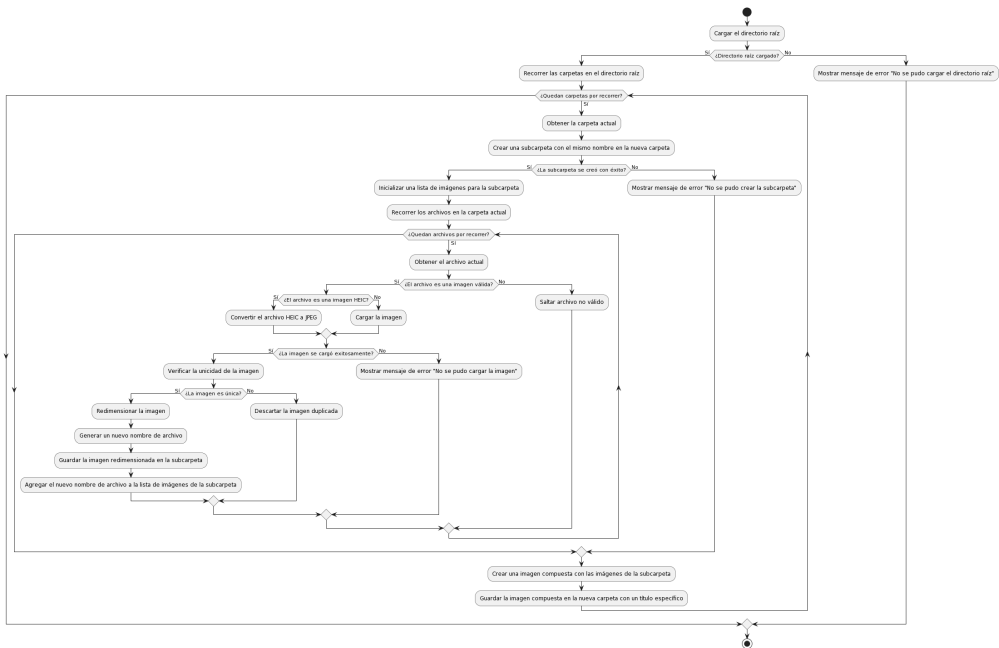


Figura 6.14: Diagrama de flujo creación base de datos (Elaboración propia). Para ver mejor ver el anexo 7.

**Fase 3: Desarrollar un algoritmo de identificación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. usando técnicas de visión artificial.**

*a) Identificación del color específico del Cryptosporidium spp.*

La imagen obtenida por el dispositivo se encuentra en el espacio de color RGB, un espacio de color limitado. La elección de transformar esta imagen al espacio de color HSV se debe a las ventajas que ofrece para el procesamiento de imágenes.

El espacio HSV proporciona una mejor separación de la información de color al representar el matiz, saturación y valor por separado. Esta separación facilita tareas como la detección de objetos basada en el color y la manipulación de colores específicos.

Además, el componente Value en HSV está directamente relacionado con la luminancia, lo que facilita ajustar la luminosidad de una imagen sin afectar significativamente los colores. En contraste, los cambios en los componentes RGB pueden tener un impacto más complejo en la apariencia del color. La correspondencia del espacio HSV con la percepción humana del color lo hace más intuitivo y útil en aplicaciones donde la interpretación visual es crucial.

En situaciones donde se requiere la segmentación de imágenes o la definición de umbrales para la detección de rangos específicos de colores, el espacio de color HSV ofrece una ventaja adicional.

**Diagrama de clases:**



**Clase ImageProcessor:** Esta clase es el punto de entrada principal que coordina el procesamiento de imágenes. Su método principal es `get_pixel_values`, que toma una ruta de imagen, ubicación de píxel, radio y color del rectángulo como argumentos. Este método realiza una serie de pasos, como cargar la imagen, definir un rectángulo alrededor de la ubicación del píxel, obtener valores de píxeles dentro de esa región y calcular umbrales de color tanto en RGB como en HSV. Retorna una tupla que contiene los valores RGB, límites inferiores y superiores en RGB, así como los valores HSV y límites en HSV.

**Clase Image:** Representa una imagen individual. Tiene un atributo `image_data` para almacenar los datos de la imagen como un arreglo NumPy (`np.ndarray`). Esta clase proporciona dos métodos:

- `load(image_path: str):` Carga una imagen desde una ruta dada y devuelve un valor booleano que indica si la carga fue exitosa.
- `get_shape():` Devuelve una tupla que representa las dimensiones de la imagen (altura, ancho, canales de color).

**Clase Rectangle:** Representa un rectángulo con atributos que describen sus coordenadas (`x1`, `y1`) y (`x2`, `y2`) junto con un color. Tiene un método `draw(image: Image)` que permite dibujar el rectángulo en una imagen específica.

**Clase ColorThresholds:** Encargada de calcular los umbrales de color. Tiene atributos para el umbral y el color medio. El método `calculate_threshold(np.ndarray)` toma un conjunto de valores de píxeles y calcula los límites inferior y superior para la umbralización de color en función del umbral y el color medio.

Además, el diagrama muestra las relaciones entre las clases:

**ImageProcessor** se relaciona con **Image**, **Rectangle** y **ColorThresholds**, ya que utiliza estas clases en su proceso de procesamiento de imágenes.

En resumen, esta estructura orientada a objetos permite un enfoque modular y organizado para procesar imágenes, donde cada clase tiene una responsabilidad clara en el proceso. La clase **ImageProcessor** coordina las acciones y utiliza otras clases para realizar tareas específicas, como cargar imágenes, dibujar rectángulos y calcular umbrales de color.

Una vez se realiza el diagrama de clases, se procede a realizar el diagrama de flujo de funcionamiento de este:

## Proceso de Procesamiento de Imágenes

### Obtención de Valores de Píxeles y Umbralización de Color

El proceso de obtención de valores de píxeles y cálculo de umbrales de color consta de dos etapas principales: la carga de la imagen y el procesamiento de la región de interés (ROI).

1. **Cargar la imagen:** El proceso comienza cargando una imagen desde la ruta especificada. Este paso es crítico ya que todo el procesamiento depende de que la imagen se cargue con éxito.
2. **Verificar si la imagen se cargó exitosamente:** Inmediatamente después de cargar la imagen, se verifica si la carga fue exitosa. Si la imagen no se carga correctamente, se emite un mensaje de error y se detiene el proceso.
3. **Verificar si la ubicación del píxel está dentro de los límites de la imagen:** Si la imagen se carga exitosamente, se verifica si la ubicación del píxel especificado está dentro de los límites de la imagen. Esto es fundamental para evitar errores al acceder a píxeles fuera de la imagen.
4. **Definir una región de interés (ROI) alrededor del píxel especificado:** Si la ubicación del píxel está dentro de los límites, se define una región de interés (ROI) alrededor del píxel especificado. El ROI es un área rectangular alrededor del píxel de interés.
5. **Dibujar un rectángulo rojo alrededor de la ROI:** Se dibuja un rectángulo rojo alrededor de la región de interés (ROI) en la imagen. Esto se hace para resaltar visualmente el área de interés.

6. **Extraer los valores de píxeles dentro de la ROI:** Se obtienen los valores de píxeles contenidos dentro de la región de interés (ROI). Estos valores representan los colores de los píxeles dentro del área del píxel de interés.
7. **Mostrar la imagen con el rectángulo rojo:** La imagen se muestra con el rectángulo rojo dibujado alrededor de la región de interés (ROI) para visualización.
8. **Obtener los valores RGB dentro de la ROI:** Los valores RGB de los píxeles dentro de la región de interés (ROI) se extraen y se almacenan.
9. **Calcular los límites superior e inferior para la umbralización de color en RGB:** Se calculan los límites superiores e inferiores para la umbralización de color en el espacio de color RGB basados en los valores RGB de la región de interés.

### **Conversión a HSV y Umbralización en HSV**

Después de obtener los valores RGB y sus límites de umbralización, se procede a la conversión al espacio de color HSV y la umbralización correspondiente.

### **Código para la Conversión de RGB a HSV:**

```
# Convertir los valores RGB a HSV  
valores_hsv = cv2.cvtColor(roi, cv2.COLOR_BGR2HSV)
```

La función `cv2.cvtColor` toma la imagen de entrada (`roi` en este caso) y el código de color que especifica la conversión deseada. En este caso, el código `cv2.COLOR_BGR2HSV` indica la conversión de BGR (el formato de color de OpenCV) a HSV.

## Explicación Matemática:

Dados los valores RGB:  $R, G, B$

Calcular el máximo y mínimo de  $R, G, B$  :

$$C_{\max} = \max(R, G, B)$$

$$C_{\min} = \min(R, G, B)$$

Calcular el valor (V):  $V = C_{\max}$

Calcular la saturación (S):

$$\text{Si } V \neq 0, \quad S = \frac{C_{\max} - C_{\min}}{C_{\max}}$$

De lo contrario,  $S = 0$

Calcular el matiz (H):

$$\text{Si } C_{\max} = R, \quad H = 60 \left( \frac{G - B}{C_{\max} - C_{\min}} \right) \quad \text{mód } 360$$

$$\text{De lo contrario, si } C_{\max} = G, \quad H = 60 \left( \frac{B - R}{C_{\max} - C_{\min}} + 2 \right) \quad \text{mód } 360$$

$$\text{De lo contrario, si } C_{\max} = B, \quad H = 60 \left( \frac{R - G}{C_{\max} - C_{\min}} + 4 \right) \quad \text{mód } 360$$

(en el código, 'H' es el componente de matiz)

## Cálculo de Límites para Umbralización en HSV:

Calcular límites superiores e inferiores para la

```

umbralización de color en HSV
color_medio_hsv = np.mean(valores_hsv, axis=0)
umbral_hsv = 30
limite_inferior_hsv = color_medio_hsv - umbral_hsv
limite_superior_hsv = color_medio_hsv + umbral_hsv

```

Este diagrama de actividades ilustra claramente el flujo de trabajo y las decisiones involucradas en el proceso de obtención de valores de píxeles y cálculo de umbrales de color a partir de una imagen. Cada paso está bien definido y se toman medidas específicas en función de las condiciones y resultados.



Figura 6.15: Diagrama de flujo HSV (Elaboración propia). Para ver mejor ver el anexo 9.

### b) Identificación de características del *Cryptosporidium* spp.

Para la extracción de características propias del microorganismo *Cryptosporidium* spp., primero se identifica su forma ovalada, su tamaño que va de  $2\ \mu\text{m}$  a  $8\ \mu\text{m}$ , y su relación tamaño micrómetros píxel. La expresión matemática para esta relación se define como  $T = \frac{8}{500} \times P$ , donde  $T$  representa el tamaño en micrómetros y  $P$  es el tamaño en píxeles.

Además, se caracteriza el color específico del microorganismo mediante la tinción de Zielh Neelsen azul de metileno. Los límites de color en HSV se han determinado en el punto anterior en donde obtenemos un espacio de color específico donde  $\text{lower} = [96, 275, 61, 278, 156, 462]$  y  $\text{upper} = [156, 565, 122, 133, 217, 032]$ .

A continuación, se presenta el funcionamiento de la parte de contornos en el código:

**Expresiones Matemáticas y Ecuaciones:** 1. Relación Tamaño en Micrómetros y Píxeles:  $T = \frac{8}{500} \times P$  (como se discutió anteriormente). 2. Límites de Color en HSV: -  $\text{lower} = [96, 275, 61, 278, 156, 462]$  (Valor HSV del píxel en la fila 1340 y columna 2275) -  $\text{upper} = [156, 565, 122, 133, 217, 032]$  (Valor HSV del píxel en la fila 1340 y columna 2275)

### **Funcionamiento de la Parte de Contornos en el Código:**

1. Encontrar Contornos en la Máscara: Se utiliza la función `cv2.findContours` para identificar los contornos en la máscara generada a partir de los lími-



tes de color definidos. La variable `contours` almacena la información de los contornos encontrados.

2. Dibujar Contornos en la Imagen Original: Mediante la función `cv2.drawContours`, se representan visualmente los contornos encontrados en la imagen original. Estos contornos se dibujan en color rojo con un grosor de 3 píxeles.

3. Contar Círculos Rojos: Se emplea `cv2.minEnclosingCircle` para encontrar el círculo mínimo que rodea cada contorno. Si el radio del círculo es mayor a 5 píxeles, se considera un círculo rojo, se dibuja en la imagen final y se cuenta.

**Valores Reales en las Ecuaciones:** 1. Relación Tamaño en Micrómetros y Píxeles: Utiliza la relación  $T = \frac{8}{500} \times P$ , donde  $P$  es el tamaño en píxeles de tu imagen. 2. Límites de Color en HSV: Utiliza los valores reales medidos en la imagen para definir los límites de color en HSV.

Estas ecuaciones y explicaciones proporcionan una base para la extracción de características y análisis de imágenes de *Cryptosporidium* spp. A continuación, se presenta una explicación de los diagramas utilizados en el diseño del código.

**Diagrama de Clases:**

El diagrama de clases presenta una estructura estática del código, representando las clases Image, Mask, Contour, ResultMessage, y ImageProcessor, junto con sus atributos y métodos. Las relaciones entre estas clases se ilustran, indicando cómo interactúan durante el procesamiento de la imagen.

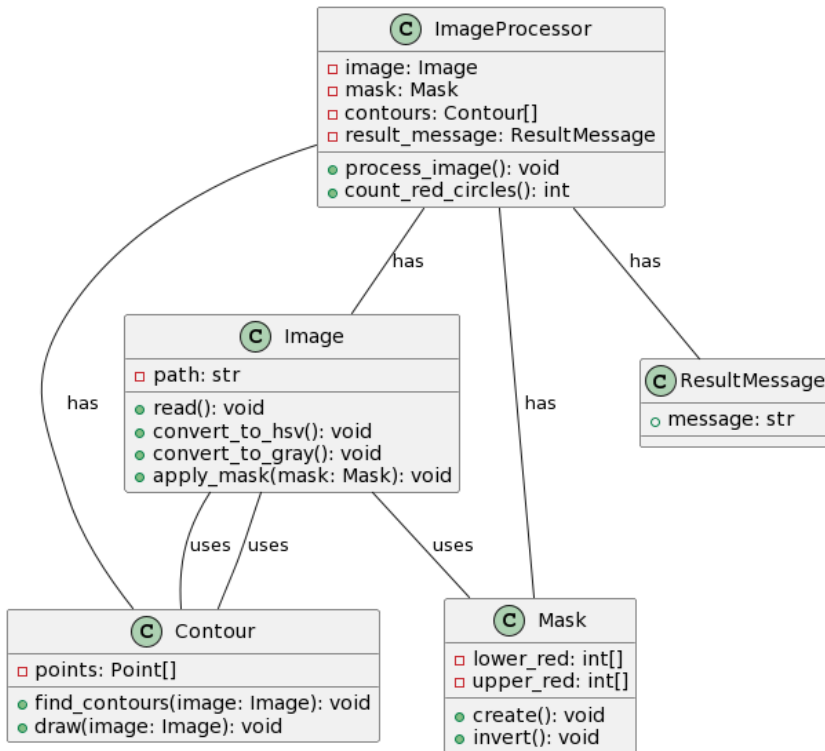


Figura 6.16: Diagrama de clases identificación de características (Elaboración propia).

**Diagrama de Flujo:** El diagrama de flujo describe el proceso de pro-

cesamiento de la imagen en varias etapas, desde la entrada de la imagen hasta la generación del mensaje de resultado.

1. **Leer la Imagen:** En este paso, el código comienza leyendo la imagen desde la ruta especificada en `image_path`. Esto se hace con la función `cv2.imread`.
2. **Convertir a HSV:** La imagen se convierte al espacio de color HSV utilizando la función `cv2.cvtColor` con `cv2.COLOR_BGR2HSV`.
3. **Convertir a Escala de Grises:** Se crea una versión en escala de grises de la imagen original utilizando `cv2.cvtColor` con `cv2.COLOR_BGR2GRAY`.
4. **Crear Máscara:** Se definen los límites de color rojo en el espacio de color HSV y se crea una máscara para filtrar el color rojo en la imagen.
5. **Invertir la Máscara:** Se invierte la máscara para obtener la máscara inversa, que representa el fondo.
6. **Aplicar Máscara al Primer Plano:** Se aplica la máscara al primer plano de la imagen para aislar los colores rojos. Esto se hace utilizando `cv2.bitwise_and`.
7. **Encontrar Contornos:** Se encuentran los contornos en la máscara utilizando `cv2.findContours`.
8. **Dibujar Contornos:** Se cambia el color de los contornos encontrados a rojo y se dibujan en la imagen original.

9. **Filtrar Regiones que no son Rojas:** Se filtran las regiones de la imagen en escala de grises que no son rojas utilizando la máscara inversa.
10. **Aumentar Contraste del Primer Plano:** El contraste del primer plano se aumenta multiplicando por un factor. Luego, se asegura que los valores estén en el rango válido (0-255).
11. **Sumar Primer Plano y Fondo:** Se suman el primer plano y el fondo para obtener una imagen compuesta.
12. **Contar Círculos Rojos:** Se cuentan los círculos rojos en los contornos detectados. Los círculos pequeños se filtran y se dibujan en la imagen final.
13. **Mostrar Imágenes:** Las imágenes procesadas se muestran en una cuadrícula de subplots.
14. **Generar Mensaje de Resultado:** Se genera un mensaje de resultado que indica si se detectaron (oo)quistes o no.
15. **Mostrar el Resultado:** El mensaje de resultado se muestra en la salida estándar.

Este diagrama de flujo representa el flujo general de las operaciones realizadas en el código para procesar una imagen y detectar (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp.

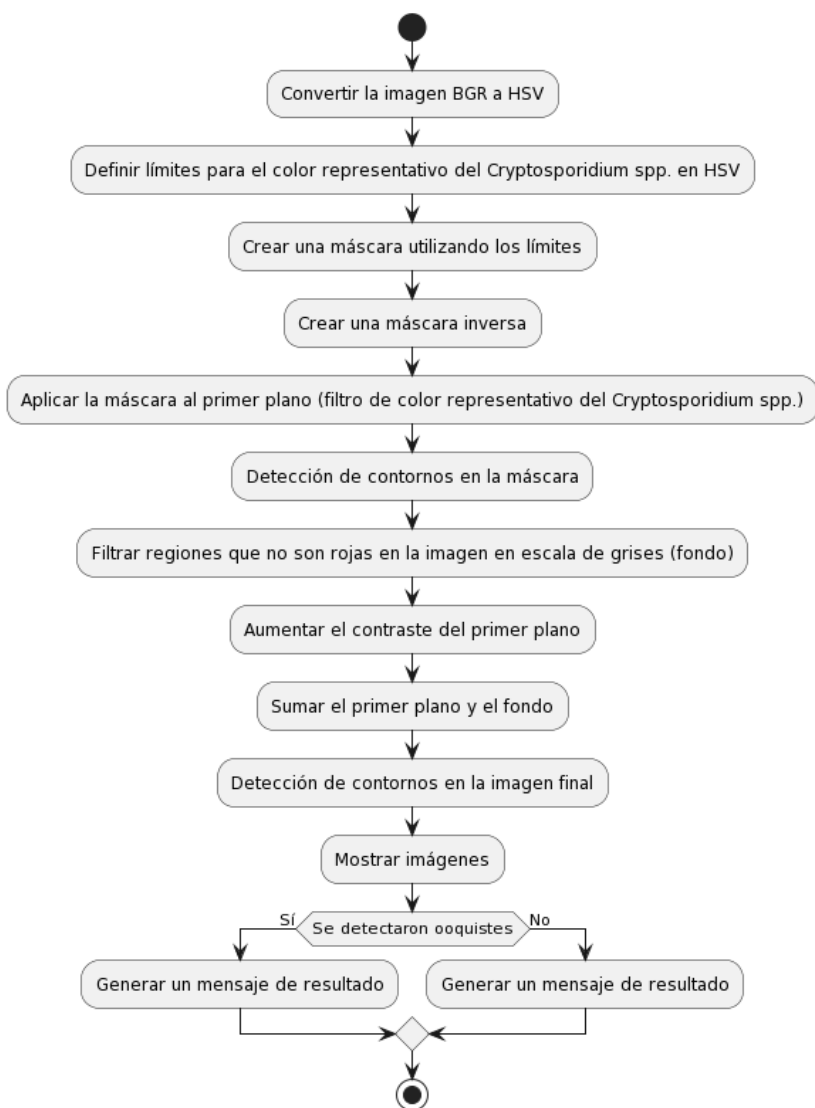


Figura 6.17: Diagrama de flujo identificación de características de *Cryptosporidium* spp.(Elaboración propia).

*c) Evaluación de la extracción de características del Cryptosporidium spp.*

Para la evaluación de las características detalladas anteriormente, se emplea un enfoque sistemático utilizando un diagrama de clases y un diagrama de flujo para describir la estructura estática y el funcionamiento del código.

**Diagrama de Clases:** El diagrama de clases representa las clases, sus atributos y métodos, así como las relaciones entre ellas. En este caso, se destacan las siguientes clases:

1. **Procesamiento de Imágenes:** Coordina el procesamiento de imágenes con métodos para procesar una imagen específica y calcular el promedio de conteos.

2. **Lectura y Escritura de Datos:** Maneja la lectura y escritura de datos, especialmente la escritura en un archivo Excel.

3. **Visualización:** Se encarga de mostrar imágenes compuestas.

4. **Manejo de Archivos:** Lista los archivos de imagen en una carpeta específica.

5. **OpenCV (cv2), Numpy (np), Pandas (pd), Matplotlib.pyplot**



datos de calidad de cada imagen.

4. **Definición de la función `process_image`:** Define una función para procesar una imagen específica y calcular el promedio de conteos.

5. **Obtención de la lista de archivos de imágenes:** Obtiene una lista de archivos de imagen en la carpeta especificada.

6. **Cálculo del número de filas y columnas:** Calcula el número de filas y columnas para organizar imágenes en una cuadrícula.

7. **Procesamiento de imágenes:** Itera a través de la lista de archivos de imágenes, procesa cada imagen y almacena los resultados en listas separadas.

8. **Cálculo del promedio de conteos:** Calcula el promedio de *Cryptosporidium* spp. encontrados en todas las imágenes utilizando la expresión matemática:

$$\text{Promedio} = \frac{\text{Total de Cryptosporidium}}{\text{Total de imágenes procesadas}}$$

9. **Creación de una imagen compuesta:** Crea una imagen compuesta que muestra todas las imágenes procesadas.

10. **Guardado de la imagen compuesta:** Guarda la imagen com-



puesta en un archivo.

11. **Mostrar la imagen compuesta:** Muestra la imagen compuesta utilizando Matplotlib.

12. **Guardado del DataFrame en un archivo Excel:** Guarda los resultados en un archivo Excel.

13. **Mensajes de salida:** Imprime mensajes en la salida estándar para informar sobre el procesamiento y los resultados.

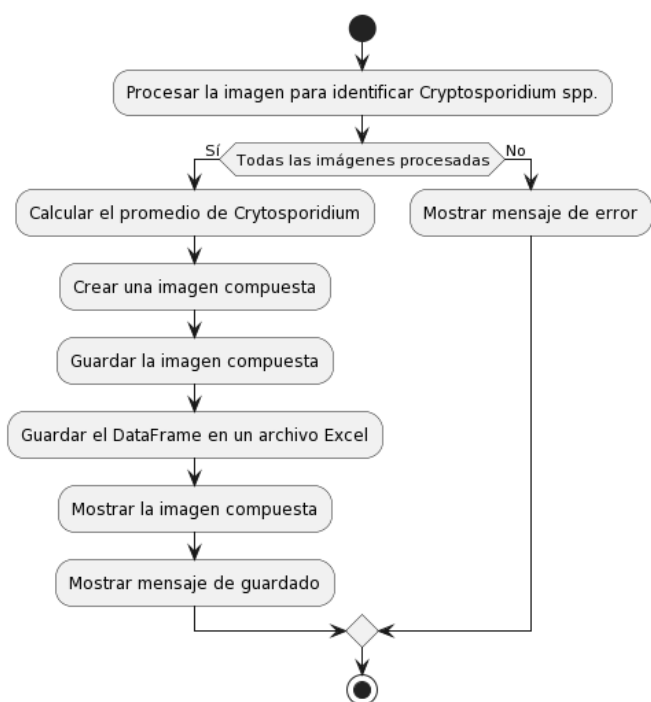


Figura 6.19: Diagrama de flujo de la evaluación del método de identificación (Elaboración propia).

*d) Implementación en producción del algoritmo validado con Python anywhere.*

El código bancket funciona utilizando la herramienta Python anywhere, se ha disponibilizado un servidor Python con acceso a internet, que cumple la función de manejar las peticiones de la aplicación móvil y realizar procesamiento y análisis de imágenes. Esta herramienta tiene como

beneficios que por un muy bajo costo, dispone de un servidor 24/7 de alta disponibilidad y con unos recursos de CPU y memoria mas que suficientes para el correcto funcionamiento del sistema:

- El proyecto: Framework (Marco de trabajo es decir cosas listas para usar como funciones)
- Flask: es un framework y se reimportan librerías
- Request : es una libreria
- Make\_response : es una funcion
- Nuestra aplicacion realiza un llamado POST a un Endpoint expuesto desde la solucion de python anywhere. Gracias al sistema de rute de Python que invocamos de la siguiente manera: `@app.route('/upload',...)` podemos hacer el envio de la imagen en Base64. El sistema, es programado para que toda solicitud que reciba sea procesada, segun los parametros establecidos.
- `file = request.files ['image']`
- request: es una variable que representa la solicitud HTTP que el servidor ha recibido del cliente (aplicacion movil). Usando el atributo files, se nos permite acceder a los archivos que vienen dentro de la solicitud, y especificamente le estamos pidiendo mapear el parametro “image”.

Una vez hemos capturado este archivo, realizamos una copia del mismo en el servidor que sera alojada con la funcion `file.save (file.filename)`.

Finalmente se solicita el procesamiento de ese archivo: `result = process_file (file.silenname)` que dispara el proceso de analisis de imagenes y retorna un resultado. El resultado, utilizando la funcion `make response` nos permite preparar el paquete de datos que sera devuelto al cliente, con un código de estado 200 para indicar que la petición fue exitosa y parámetros adicionales que brindan la informacion arrojada por el software de procesamiento.

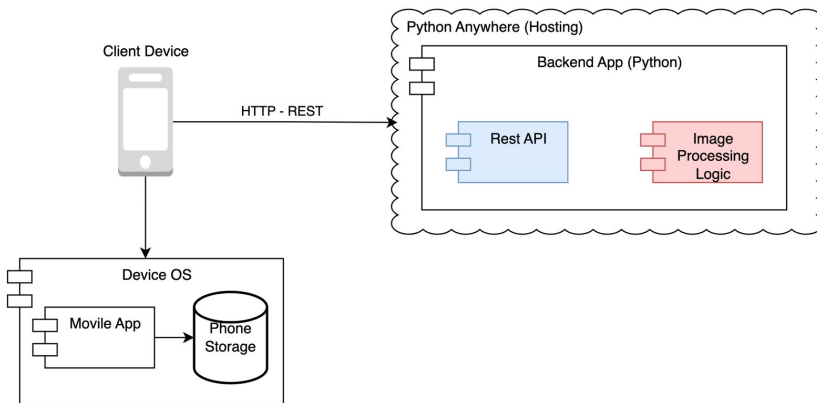


Figura 6.20: Arquitectura del sistema backend (Elaboración propia).

*e) Desarrollo del user flow para la construcción de la app móvil.*

Se realizó un diagrama de user flow que muestra el proceso que de-

ben seguir los usuarios para realizar todas las posibles funciones disponibles en la app.

Este comienza, cuando el usuario decide analizar una muestra de agua, lo cual siendo la primera interacción solicita los permisos de acceso a la cámara y a la galería de imágenes. luego, tiene 2 posibilidades: tomar una foto o subir una foto desde la galería; una vez se ha proporcionado una imagen se realiza la previsualización de la muestra y se procede a realizar su análisis. El resultado de esta acción se puede descomponer en dos posibles caminos. El primero es un mensaje de error, en donde la imagen no es legible, con lo cual se proporcionan unas recomendaciones al usuario, así como la opción de volver a tomar la imagen con la cámara o subir una nueva foto desde la galería. Si la imagen es legible esta se procesa y arroja un resultado en donde puede visualizar la imagen, confirmación del microorganismo en la muestra analizada, nombre del microorganismo y el número total de microorganismos presentes en la muestra. En la pantalla de visualización se permite la toma de notas y una opción para hacer una copia local de la muestra. Si el usuario decide cerrar la pantalla, la muestra no será guardada. Finalmente la aplicación cuenta con una pantalla para visualizar el histórico de muestras, que permite la consulta de todas las muestras previamente procesadas y guardadas.



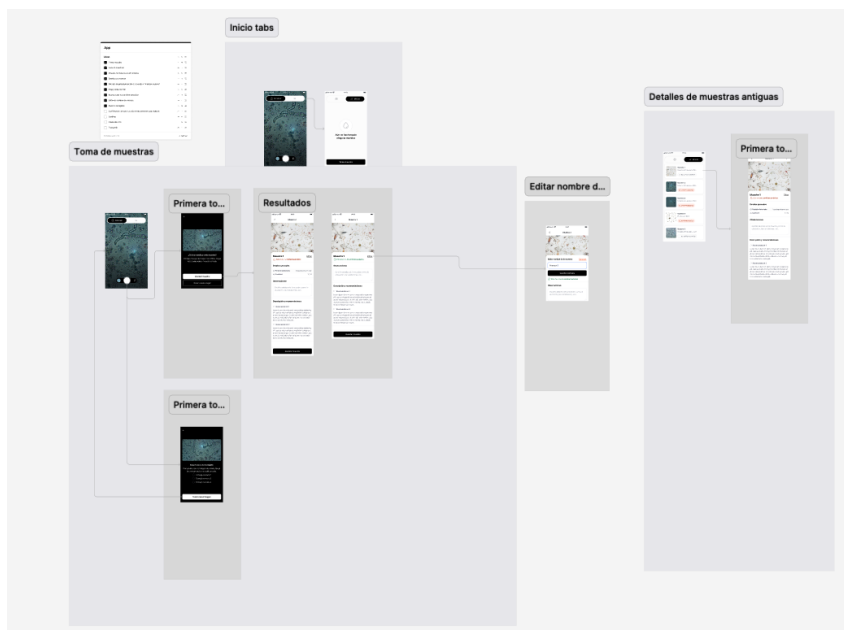


Figura 6.22: Diseño UX/UI (Elaboración propia).

Para ver mejor ingresar a este link: [Enlace al proyecto en Figma](#)

*g) Desarrollo de la app móvil en Flutter.*

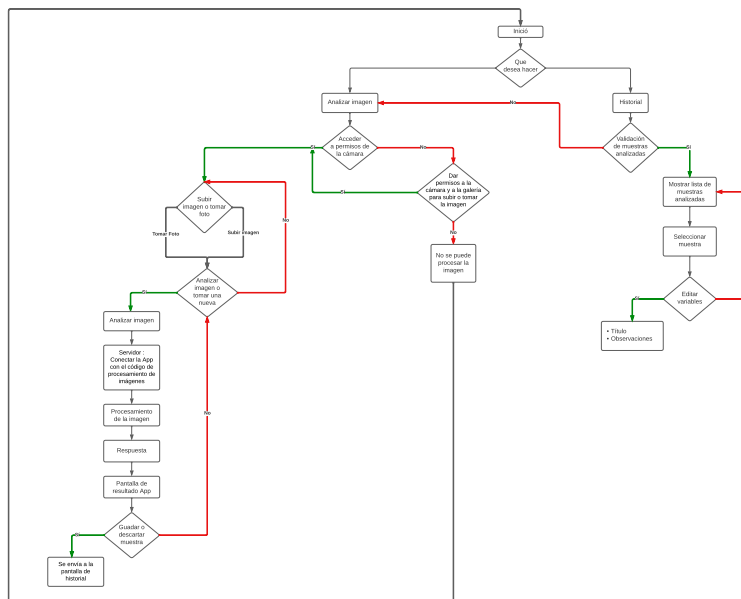


Figura 6.23: Diagrama del funcionamiento del código en flutter (Elaboración propia). Para ver mejor vea el anexo 12.

**Fase 4. Evaluar el desempeño del sistema centrado en la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. por medio de comparación con la prueba Gold standard.**

La evaluación del rendimiento de un modelo de procesamiento de imágenes es esencial para comprender su eficacia en la tarea asignada. Una herramienta crucial en este proceso es la **matriz de confusión**, que



proporciona una representación detallada de la relación entre las predicciones del modelo y los resultados reales. La matriz de confusión es particularmente útil cuando se trabaja con clasificación, ya que desglosa la precisión del modelo en categorías específicas.

La creación de una matriz de confusión permite una evaluación más profunda del modelo, y este análisis se vuelve fundamental para comprender cómo se comporta en términos de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. Sin embargo, en la práctica, analizar directamente la matriz de confusión puede resultar complicado debido a la cantidad de información que presenta.

### **Funciones para Leer Datos Reales y Predichos:**

- `read_real_data(csv_path)`: Lee los datos reales desde un archivo CSV y los almacena en un diccionario donde las claves son los nombres de las imágenes y los valores son diccionarios con las etiquetas y las cantidades reales.
- `read_predicted_data(csv_path)`: Similar a la función anterior, lee los datos predichos desde un archivo CSV y los almacena en un diccionario de manera similar a los datos reales.

### **Función para Evaluar y Guardar Resultados:**

- `evaluate_and_save_results(real_data, predicted_data, output_excel_path)`: Evalúa el rendimiento del modelo comparando las etiquetas reales y predichas. Calcula la matriz de confusión y crea un DataFrame con información detallada, luego guarda esta información en un archivo Excel.

### **Rutas de Archivos:**

- `real_data_path` y `predicted_data_path`: Rutas a los archivos CSV que contienen los datos reales y predichos, respectivamente.
- `output_excel_path`: Ruta al archivo Excel donde se guardarán los resultados.

### **Lectura de Datos Reales y Predichos:**

- `real_data = read_real_data(real_data_path)`: Lee los datos reales.
- `predicted_data = read_predicted_data(predicted_data_path)`: Lee los datos predichos.

### **Evaluación y Guardado de Resultados:**

- `conf_matrix, results_df = evaluate_and_save_results(real_predicted_data, output_excel_path)`: Llama a la función de evaluación y guarda los resultados en un archivo Excel. Obtiene la matriz de confusión y un DataFrame con detalles.

### **Cálculo de Métricas de Evaluación:**

- `accuracy, precision, recall, y f1`: Calcula varias métricas de evaluación utilizando las funciones de la biblioteca `scikit-learn`.

### **Visualización de Resultados:**

Se utiliza la biblioteca `seaborn` y `matplotlib` para visualizar la matriz de confusión acumulada y comparar las cantidades reales y predichas en un mapa de calor.

### **Mapas de Calor:**

Se crean dos subgráficos: uno para la matriz de confusión acumulada y otro para la comparación de cantidades reales y predichas. Los mapas de calor son generados utilizando `sns.heatmap`.

### **Mostrar Resultados:**

`plt.show()`: Muestra los mapas de calor.

En resumen, este código evalúa el rendimiento de un modelo de procesamiento de imágenes, calcula métricas de evaluación y visualiza los resultados mediante mapas de calor. También guarda los resultados en un archivo Excel.

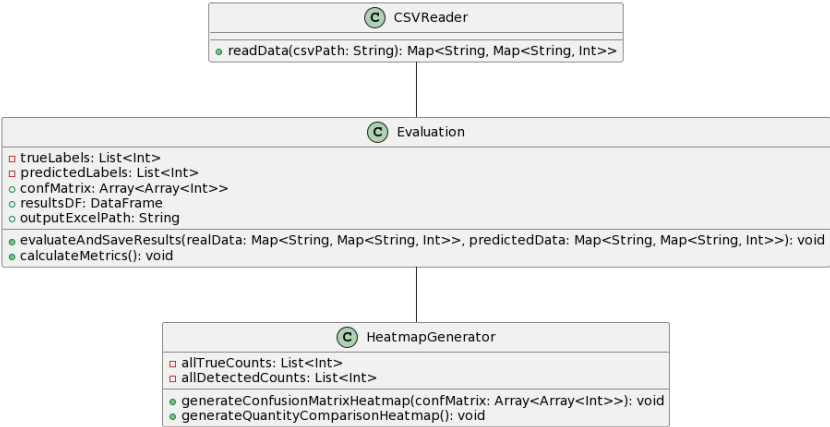


Figura 6.24: Diagrama de clases matriz de confusión (Elaboración propia).

A continuación se explica el diagrama de flujo:

**1. Leer Datos Reales:**

La aplicación inicia leyendo los datos reales desde un archivo CSV.

**2. Leer Datos Predichos:**

Después de leer los datos reales, la aplicación procede a leer los datos predichos desde otro archivo CSV.

### **3. ¿Datos Leídos correctamente?:**

Se realiza una verificación para asegurarse de que ambos conjuntos de datos se hayan leído correctamente.

- Sí: Si ambos conjuntos de datos se han leído correctamente, la aplicación procede al paso 5.
- No: Si hay algún problema con la lectura de datos, se muestra un mensaje de error y el flujo se detiene.

### **4. Evaluar y Guardar Resultados:**

Con los datos reales y predichos disponibles, la aplicación evalúa y guarda los resultados en un archivo Excel.

### **5. ¿Resultados guardados?:**

Después de evaluar y guardar los resultados, se verifica si la operación fue exitosa.

- Sí: Si los resultados se han guardado correctamente, la aplicación procede al paso 7.
- No: Si hay algún problema al guardar los resultados, se muestra un mensaje de error y el flujo se detiene.

## 6. Calcular Métricas de Evaluación:

Con los resultados guardados, la aplicación realiza cálculos para obtener métricas de evaluación como exactitud, precisión, sensibilidad y puntuación F1.

## 7. Matriz de Confusión:

$\text{conf\_matrix}_{ij}$  = Número de instancias de la clase  $i$  que fueron clasificadas como clase  $j$

**Exactitud (Accuracy):** La exactitud mide la proporción de predicciones correctas entre el total de predicciones.

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Número de predicciones correctas}}{\text{Número total de predicciones}} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}}$$

**Precisión (Precision):** La precisión mide la proporción de instancias positivas correctamente clasificadas entre todas las instancias clasificadas como positivas.

$$\text{Precisión} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

**Sensibilidad (Recall):** La sensibilidad (o recall) mide la proporción de instancias positivas correctamente clasificadas entre todas las instancias que son realmente positivas.

$$\text{Sensibilidad (Recall)} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$$

**Puntuación F1:** La puntuación F1 es la media armónica de precisión y recall y proporciona un equilibrio entre ambas métricas.

$$\text{Puntuación F1} = \frac{2 \times \text{Precisión} \times \text{Recall}}{\text{Precisión} + \text{Recall}}$$

Donde:

- TP: Verdaderos positivos (True Positives)
- TN: Verdaderos negativos (True Negatives)
- FP: Falsos positivos (False Positives)
- FN: Falsos negativos (False Negatives)

Estas ecuaciones representan las métricas de evaluación que se calculan en la parte del código relacionada con la evaluación del rendimiento del modelo.

## 8. Generar Mapa de Calor para Matriz de Confusión:

Matriz de Confusión: La intensidad de los colores en el mapa de calor representa la cantidad de instancias en cada categoría. Las celdas más oscuras indican valores más altos.

### **9. Generar Mapa de Calor para Comparación de Cantidades:**

Comparación de Cantidades: El mapa de calor compara las cantidades reales y predichas para todas las imágenes. Las celdas más oscuras indican una mayor coincidencia entre las cantidades reales y predichas.

### **10. Mostrar Resultados:**

Finalmente, la aplicación muestra la información y los resultados obtenidos durante la evaluación.

En resumen, el diagrama de flujo representa cómo el programa procesa los datos, evalúa los resultados, y genera visualizaciones y métricas para su análisis. Los puntos de decisión (condiciones) aseguran que el programa maneje situaciones en las que la lectura o el guardado de datos puedan fallar.



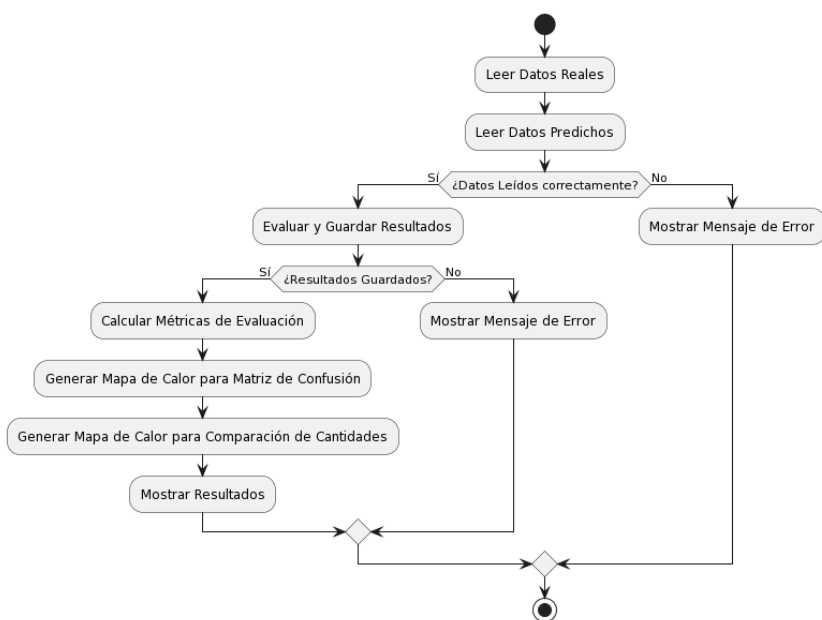


Figura 6.25: Diagrama de flujo de la matriz de confusion(Elaboración propia).

Como parte de la evaluación del método de rendimiento y comparación de los resultados esperados y obtenidos por el procesamiento de las muestras preparadas en laboratorio se establece bajo el manual de microscopia y la SM 1623.1, el proceso de dilución de las muestras, escogiendo las concentraciones de 101, 103, 105 como las diluciones patrón con el fin de establecer bajo herramientas estadísticas el índice de identificación que parte de la presencia de (oo)quistes por muestra procesada, de la misma manera se establece bajo las Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual (Ar-

nado, 2008) la cantidad de campos y área del campo de visualización, estableciendo que en una magnificación de 1000x, necesaria para visualizar microorganismos de 2-10  $\mu$  m (rango de tamaño del *Cryptosporidium* spp.) Se debe tener un área de visualización de 0,8 mm o 800  $\mu$ m. De igual manera se adopta la referencia de Arnedo- 2008 Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual - para definir la cantidad de campos a observar, capturar y analizar, definiendo un total de 30 campos al azar.

Para la preparación de las muestras, se debe diluir una alícuota de una muestra patrón comercial que contenga una concentración conocida, definiendo con esa concentración un estimado teórico de la cantidad de (oo)quistes encontrados en las muestras procesadas, asegurando en el momento de la evaluación del sistema, una comparación teórica -real entre lo identificado y contado por el dispositivo, entregando por medio del software un dato cuantitativo según la cantidad de campos analizados según las concentraciones mencionadas anteriormente. Posteriormente estos datos deben pasar por un análisis estadístico para establecer bajo la desviación estándar, precisión y exactitud el porcentaje de aciertos de nuestro sistema al momento de identificar y cuantificar *Cryptosporidium* spp. y comparar los resultados con el certificado emitido por el profesional contratado para realizar el procesamiento de las muestras enviadas al laboratorio certificado según resolución 1615 del 2015.

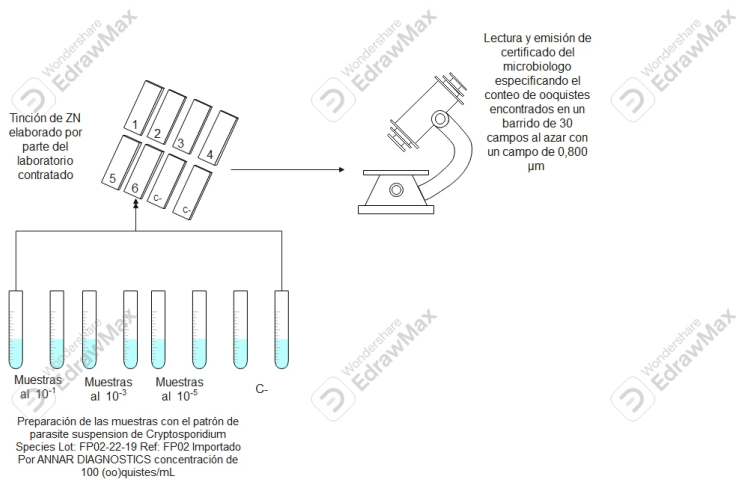


Figura 6.26: Evaluación de las muestras en el servicio de laboratorio contratado (Elaboración propia).

La desviación estándar se calcula mediante la ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

La exactitud se calcula mediante la ecuación:

$$E = \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3)$$

# Resultados y discusión

Con el objetivo de obtener resultados, conforme se detalla en la sección de metodología, se implementa un sistema que organiza y estandariza los requerimientos. Esto se lleva a cabo para respaldar tanto el proceso de toma de decisiones como la evaluación de los resultados. Este enfoque se traduce en el siguiente resultado:

- Requerimiento 1: El sistema debe medir, máximo 60 x 60 x 60 cm de alto, ancho y largo.
- Requerimiento 2: El sistema debe contar con una montura RMS para un lente objetivo de 100x.
- Requerimiento 3: El sistema debe contar con un interruptor que encienda y apague la luz del portaobjetos.

- Requerimiento 4 El sistema debe ser capaz de enfocar de forma manual, con precisión de movimiento de 1mm.
- Requerimiento 5 El sistema debe ser capaz de adquirir imágenes mediante un dispositivo móvil que cumpla con los siguientes requisitos mínimos:
  - Resolución de la cámara de al menos 12 megapíxeles.
  - Memoria RAM de al menos 4 gigabytes.
  - Dimensiones físicas del dispositivo dentro del rango de 154-165 mm de largo, 74,5-76,2 mm de ancho y 7,8-8,3 mm de profundidad.
- Requerimiento 6: El sistema debe pesar máximo 15kg.
- Requerimiento 7: El sistema debe contar con su propia fuente de alimentación de 5-9v DC.
- Requerimiento 8: El sistema debe tener la capacidad de mover la placa porta objetos y enfocar las muestras.
- Requerimiento 9: El sistema debe poder adquirir imágenes con un objetivo de 100x con una apertura de 1.25 en las muestras de aguas.
- Requerimiento 10: Contar con un API (interfaz de programación de aplicaciones) que permite el envío de imágenes a ser procesadas.

- Requerimiento 11: El sistema debe ser resistente a la corrosión por fluidos.
- Requerimiento 12: El sistema debe contar con un software que permita la identificación de *Cryptosporidium* spp, en muestras de agua.
- Requerimiento 13: El sistema debe contar con un mecanismo que permita regular de manera manual la exposición de luz y posición en x,y de la placa que contenga las muestras para la identificación del microorganismo.
- Requerimiento 14: El sistema debe contar con una interfaz de usuario que le permita iniciar el protocolo de captura de imágenes.
- Requerimiento 15: El sistema debe arrojar un dato numérico sobre la cantidad de cóccidos encontrados por muestra.
- Requerimiento 16: El dispositivo debe cumplir con el artículo 10 numeral b y el artículo 11 párrafo 3 de la resolución 2115 del 2007.
- Requerimiento 17: El resultado obtenido debe ser comparado con el análisis de laboratorio.
- Requerimiento 18: El dispositivo debe cumplir con los protocolos establecidos en el manual de microscopía y manejo de coccidios.

Continuando con el proceso de recopilación y actualización de requerimientos, se obtienen los siguientes resultados:

## **Resultados del Objetivo 1:**

### **1. Requerimientos para el microorganismo:**

Los sistemas de evaluación determinan que los siguientes requerimientos son necesarios para garantizar el adecuado desarrollo del proceso de observación. Estos se derivan de la evaluación del tamaño del microorganismo, la metodología de identificación basada en parámetros microscópicos y las directrices de manipulación contenidas en el SM-1623 de la EPA en 2005 y el SM-9711 de 2017.

Los requerimientos relacionados con el microorganismo se derivan de las observaciones realizadas a las necesidades estipuladas en la matriz QFD. Se establece que, para lograr la identificación del microorganismo, es esencial implementar la técnica de tinción de Ziehl Neelsen (ZN) al procesar 100 cm<sup>3</sup> de muestra. Esta elección se basa en el tamaño del microorganismo, que varía entre 0.2 y 0.8 micrómetros según el SM-9711 del 2017 exigiendo el empleo de esta técnica para garantizar su correcta visualización. Dando como resultado que los requerimientos ( R. 18, R.17 y R.15 ) son los asociados al cumplimiento de las exigencias del microorganismo.

## **2. Requerimientos para el dispositivo:**

A continuación, se presentan los requerimientos que debe tener el dispositivo para poder adquirir imágenes microscópicas:

- Según la guía de microscopía del Standard Method 9711 del 2017 es necesario contar con un instrumento óptico que permite visualizar con mayor detalle las características de los organismos microscópicos, esto con el fin de identificarlos morfológicamente o lograr un acercamiento por medio de otras técnicas como la tinción para lograr su identificación o caracterización.

- Según la guía de microscopía de Standard Method 1623 de la EPA, 2005, es necesario que exista un sistema para desplazar la muestra retenida en un portaobjetos, esto con el fin de darle un extendido a la búsqueda en las muestras, asegurando una manipulación indirecta y precisa.

- Según el protocolo de adquisición y observación por microscopía de la ISO 9345 del 2019 se debe contar con un complejo de lentes que le permitan una magnificación en las muestras observadas, también se especifica las Dimensiones de interconexión para componentes de imagen: Este documento especifica las dimensiones relacionadas óptica y mecánicamente para obtener imágenes de los componentes de un microscopio, como a) las dimensiones relacionadas con el objetivo, ocular y lente de tubo, b) las dimensiones de los tipos de rosca de tornillo para



conectar un objetivo de microscopio a la boquilla, y c) los diámetros de los oculares intercambiables y los tubos de observación correspondientes de los microscopios.

- Una diferencia importante entre un microscopio de laboratorio y uno portable, es su peso, área ocupada y su fuente de alimentación, se define como microscopio portable a todo aquello que en su manipulación, no refleje un peso por encima de los 18 Kg para las mujeres y que no supere de los 25 Kg para los hombres según la universidad de Málaga (UMA, 2006) , respecto a las medidas de portabilidad, se establece una diferencia marcada en que no supere los 60 centímetros para los hombres y los 55 cm para las mujeres, cabe resaltar que estas medidas varían de acuerdo a la forma, volumen y masa que tenga el objeto.(UMA, 2006)

- Es posible conocer por medio del proyecto AI SCOPE de (Díez, 2020) y la normativa ISO 8255-1: 2017, los requerimientos dimensionales para la construcción de un microscopio de amplitud de luz visible que se encuentre entre los 0,2  $\mu\text{m}$  a los 0,7  $\mu\text{m}$ , por ende debe contar con un sistema de iluminación y un sistema mecánico que permita el direccionamiento del haz de luz.

Dando como resultado que los requerimientos ( R. 1, R. 2, R.3, R.4, R.5,R. 6, R.7, R.8, R.9, R.11, R.13, R.16 ) son los asociados al cumplimiento de las exigencias del dispositivo.

### 3. Requerimientos para el software:

Los requerimientos de Software han sido establecidos para brindar una solución que aunque sencilla permita el correcto cumplimiento de las necesidades del proyecto.

Para lo cual se aborda el software desde 3 capas diferentes, siendo la aplicación la primera capa, el desarrollo de una aplicación web basada en Python, que permite la gestión de solicitudes http bajo arquitectura RESTful y finalmente una solución de procesamiento de imágenes que permita la identificación del microorganismo.

Para la aplicación mobile se establecen las siguientes características como los requerimientos mínimos funcionales y no funcionales:

- Requerimientos funcionales:
  - El sistema debe contar con un software que permita la identificación de *Cryptosporidium* spp, en muestras de agua.
  - El sistema debe arrojar un dato numérico sobre la cantidad de cóccidos encontrados por muestra.
  - La aplicación debe permitir aprovechar la cámara del dispositivo de manera tal que pueda tomar fotografías de las muestras.

- La aplicación debe enviar la fotografía a un servidor en la nube para que ésta sea procesada.
- La aplicación debe contar con una pantalla que permite la previsualización de la foto a ser validada, y una pantalla para visualizar los resultados una vez el algoritmo de visión artificial haya identificado la presencia o no del microorganismo.
- Requerimiento no funcionales:
  - La aplicación debe correr en un dispositivo Android con una versión de Android 10 o superior.
  - La aplicación debe correr en un dispositivo iOS con una versión iOS 15 o superior.
  - La aplicación debe gestionar los permisos necesarios para el adecuado uso de la cámara y galería de fotos.

A nivel del almacenamiento de las fotografías los requerimientos mínimos necesarios son:

1. El aplicativo debe ofrecerle al usuario la opción de almacenar los datos de la muestra procesada.
2. Brindar un End Point o Ruta de carga donde serán enviadas las fotografías de la aplicación mobile.

3. Brindar un End Point o Ruta para la consulta de las fotografías previamente tomadas que pueda ser accesible para la solución de procesamiento de visión artificial.

Finalmente, para la solución de software que realizará el procesamiento y validación de visión artificial se definen éstos como los requerimientos mínimos necesarios funcionales y no funcionales:

- Requerimientos funcionales:
  - Contar con un API (interfaz de programación de aplicaciones) que permite el envío de imágenes a ser procesadas.
  - Contar con un API (interfaz de programación de aplicaciones) que permita obtener la respuesta del algoritmo de procesamiento de imagen.
  - Establecer un entorno de extracción de características que permita indicarle al software cuáles imágenes contienen el microorganismo.
- Requerimiento no funcionales:
  - Estar disponible en internet para recibir y manejar las solicitudes de la aplicación en el momento que se desee.
  - Establecer unos parámetros mínimos de conexión que permitan una comunicación segura entre la aplicación y esta solución.

- Tener acceso al sistema de almacenamiento para la consulta de las fotografías a procesar.

#### 4. Priorización y ponderación de los requerimientos.

De acuerdo a la organización vista en la figura 6.2 y aplicación la metodología de evaluación de la matriz QFD, se establece el siguiente resultado:

Necesidades	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
Portabilidad	5	2	2	3	3	5	3	3	3	1	3	1	2	1	1	2	1	2
Enfoque	2	5	3	5	2	2	3	5	5	1	2	3	3	3	2	1	1	4
Iluminación	2	2	5	4	2	2	5	3	2	1	2	3	5	3	1	1	1	4
Resistencia a la corrosión	1	1	1	1	1	1	3	2	2	1	5	1	2	1	1	1	1	2
Identificación del microorganismo	1	4	3	5	2	1	3	5	4	3	2	5	4	4	5	3	3	5
Visualización microscópica	1	5	2	5	4	1	4	4	5	1	2	4	4	4	4	4	1	5
Captura de imagen	1	4	2	4	5	1	2	3	4	1	2	4	3	5	4	3	1	3
Reporte de los resultados	1	1	1	3	4	1	1	2	2	5	1	4	1	5	5	5	5	5
Total	14	24	19	30	23	14	24	27	27	14	19	2	24	26	23	20	14	30

Figura 7.1: Matriz QFD de los requerimientos relacionados con el microorganismo y el dispositivo (Elaboración propia).

Después de evaluar cada requerimiento en función de las 8 necesidades, se calcula un puntaje total, que luego se utiliza para llevar a cabo la priorización de requerimientos, como se detalla en la siguiente figura.

Requerimiento	Puntaje total	Nivel de prioridad
R4	30	N1
R18		
R8	27	N2
R9		
R14	26	N3
R12	25	N4
R7	24	N5
R13		
R2		
R5	23	N6
R15		
R16	20	N7
R3	19	N8
R11		
R1	14	N9
R6		
R10		
R17		

Figura 7.2: Priorización de requerimientos relacionados con el microorganismo y el dispositivo (Elaboración propia).

En esta figura se detallan los requerimientos y se encuentran agrupados según su puntaje total y se han ordenado de mayor a menor. Además, se les ha asignado un nivel de prioridad, donde el nivel 1 representa los requerimientos más importantes y el nivel 9 los menos importantes.

La relación entre los requerimientos y su puntaje o peso está directamente relacionada con la prioridad de cumplimiento. En este contexto, los requerimientos de nivel 1 y 2 corresponden a los requerimientos 4, 18 y 8, 9, respectivamente. Estos son considerados como los requerimientos prioritarios y de importancia fundamental para el desarrollo del proyecto.

## 5. Refinamiento de los requerimientos

- Elección del material de la estructura principal

Criterio	Relación requerimiento	Peso
El peso el material debe estar entre 0,719 g/cm <sup>3</sup> y 2.72 g/cm <sup>3</sup>	R6 / N9	2
Resistencia a la corrosión en un rango de humedad del 77-87%	R11 / N8	2
Densidad entre 1 - 5 g/cm <sup>3</sup>	R1,R6 / N9	5
Accesibilidad económica	NA	1
Facilidad de encontrar un proveedor	NA	1
Resistencia al desgaste por fricción	R11 / N8	2
Temperatura de deformación <80°C	R2 / N5	3

Figura 7.3: Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.2 para la elección de los materiales de construcción del dispositivo (Elaboración propia).

A partir de la figura 7.3 en donde se establece la escala de evaluación dependiendo de la relación entre los criterios y los requerimientos, cada criterio recibe un peso en función de su importancia con respecto a los requerimientos y su nivel de prioridad. Esta evaluación se refleja en la figura 7.4.

Criterio	Acero	Acero inoxidable	Aluminio	Titanio	PLA	Caucho	Acrílico
El peso el material debe estar entre 0,719 g/cm <sup>3</sup> y 2.72 g/cm <sup>3</sup>	7.8	7.7	2.7	4.5	1.0	1.3	1.18
Resistencia a la corrosión en un rango de humedad del 77-87%	40%	70%	90%	90%	N/A	N/A	N/A
Densidad entre 1 - 5 g/cm <sup>3</sup>	4.750 pesos/kg	7.905 pesos/Kg	5.200 pesos /Kg	49.100 pesos / Kg	8000 pesos /Kg	5.500 pesos / Kg	630 pesos/Kg
Accesibilidad económica y facilidad de encontrar un proveedor	Fácil	Fácil	Fácil	Difícil	Fácil	Fácil	Fácil
Resistencia al desgaste por fricción	1500 °C	1510°C	660 °C	1668°C	170°C	80°C	160°C
Temperatura de deformación <80°C							

Figura 7.4: Valores de referencia de cada material (Elaboración propia).

A continuación se observa la figura 7.4 en donde se muestran los valores de referencia de cada material en relación a cada criterio.



Estructura principal							
Criterios (Requerimientos)	Materiales						
	Acero	Acero inoxidable	Aluminio	Titanio	PLA	Caucho	Acrílico
El peso el material debe estar entre 0,719 g/cm <sup>3</sup> y 2.72 g/cm <sup>3</sup>	0	0	2	0	2	2	2
Resistencia a la corrosión en un rango de humedad del 77-87%	0	2	2	2	2	2	2
Densidad entre 1 - 2.7 g/cm <sup>3</sup>	0	0	0	0	5	5	5
Accesibilidad económica	1	1	1	0	1	1	1
Facilidad de encontrar un proveedor	1	1	1	0	1	1	1
Resistencia al desgaste por fricción	2	2	2	2	2	0	2
Temperatura de deformación <80°C	3	3	3	3	3	0	3
Total	7	9	11	7	16	11	16

Figura 7.5: Evaluación de materiales (Elaboración propia).

En la figura 7.5 presenta la evaluación detallada de los materiales en función de los criterios. Cada material se evalúa considerando su valor de referencia como se observa en la figura 7.4 con respecto a cada criterio y se le asigna un peso según lo establecido en la figura 7.5.

Como resultado de este proceso de evaluación y selección, se obtiene un puntaje para cada material en función de su cumplimiento con los criterios y requerimientos. En este caso, los materiales PLA y Acrílico destacan con un puntaje máximo de 16 puntos, lo que los convierte en los materiales seleccionados para la construcción de la estructura principal del dispositivo, ya que cumplen de manera óptima con todos los criterios

y requerimientos establecidos.

Este proceso garantiza una selección fundamentada de materiales que se ajustan perfectamente a las necesidades y criterios específicos del proyecto.

- Sistema de enfoque

Criterio	Relación requerimiento	Peso
El sistema de soporte del lente debe cumplir con la ISO 9345 del 2019 para sus dimensiones de interconexión para componentes de proyección de imágenes.	R2 / N5	3
El sistema debe asegurar un mínimo de 1000 aumentos	R4/ N1	4
El sistema debe asegurar la correcta proyección de la imagen entre los lentes con una resolución de mínimo 0.2 $\mu\text{m}$	R8/ N2	4
El sistema debe cumplir con las tolerancias permisibles entre los lentes según la norma 8255-1 DEL 2017	R9/ N2	4
El sistema debe poder procesar un mínimo de 100cm <sup>3</sup> de muestra según la resolución 2115 de 2007 Artículo 11.	R18/ N1	4
El sistema debe ser capaz de reducir de manera eficiente cualquier tipo de ruido no deseado presente en la imagen, vibraciones mecánicas y fluctuaciones de iluminación.	R4, R8, R18 / N1, N2	5
El sistema debe lograr un enfoque milimétrico que permita la observación detallada de la muestra sin desviaciones apreciables.	R4, R8 / N1, N2	5
El sistema debe ser robusto y resistente a perturbaciones externas, como vibraciones ambientales, para mantener un enfoque estable a lo largo del tiempo.	R1, R6 / N9	5

Figura 7.6: Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.2 para el sistema de enfoque (Elaboración propia).

A partir de la figura 6.3 en donde se establece la escala de evaluación dependiendo de la relación entre los criterios y los requerimientos, cada criterio recibe un peso en función de su importancia con respecto a los requerimientos y su nivel de prioridad. Esta evaluación se refleja en la figura 7.7.

Matriz de decisión del sistema de enfoque				
Criterios (Requerimientos)	Sistema de enfoque			
	Sistema 1 / Prototipo 1	Sistema 2 / Prototipo 2	Sistema 3 / Prototipo 3	Sistema 4 / Prototipo 4
El sistema de soporte del lente debe cumplir con la ISO 9345 del 2019 para sus dimensiones de interconexión para componentes de proyección de imágenes.	0	3	3	3
El sistema debe asegurar un mínimo de 1000 aumentos	0	0	4	4
El sistema debe asegurar la correcta proyección de la imagen entre los lentes con una resolución de mínimo 0.2 $\mu\text{m}$	0	0	4	4
El sistema debe cumplir con las tolerancias permisibles entre los lentes según la norma 8255-1 DEL 2017	0	4	4	4
El sistema debe poder procesar un mínimo de 100cm <sup>3</sup> de muestra según la resolución 2115 de 2007 Artículo 11.	4	4	4	4
El sistema debe poder procesar un mínimo de 100cm <sup>3</sup> de muestra según la resolución 2115 de 2007 Artículo 11.	0	0	4	4
El sistema debe ser capaz de reducir de manera eficiente cualquier tipo de ruido no deseado presente en la imagen, vibraciones mecánicas y fluctuaciones de iluminación.	0	0	0	5
El sistema debe lograr un enfoque milimétrico que permita la observación detallada de la muestra sin desviaciones apreciables.	0	0	5	5
El sistema debe ser robusto y resistente a perturbaciones externas, como vibraciones ambientales, para mantener un enfoque estable a lo largo del tiempo.	0	0	0	5
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>28</b>	<b>38</b>

Figura 7.7: Evaluación del sistema de enfoque (Elaboración propia).

En la figura 7.8 presenta la evaluación detallada de los 4 sistemas de enfoques desarrollados con respecto a cada criterio. Cada uno de estos se evalúa considerando su relación con respecto a cada criterio y se le asigna un peso según lo establecido en la figura 7.7.

Como resultado de este proceso de evaluación y selección, se obtiene un puntaje para cada sistema de enfoque en función de su cumplimiento con los criterios y requerimientos. En este caso el sistema con mayor puntaje fue el sistema 4 con un puntaje máximo de 38 puntos siendo el seleccionado para la construcción del sistema de enfoque del dispositivo, ya que cumple de manera óptima con todos los criterios y requerimientos establecidos.

Este proceso garantiza una selección fundamentada del sistema de enfoque el cual se ajusta perfectamente a las necesidades y criterios específicos del proyecto.

- Sistema de iluminación

<b>Criterio</b>	<b>Relacion requerimiento</b>	<b>Peso</b>
Debe producir un <u>minimo</u> de 100 a 1000 lumens de potencia según la norma ISO 9345 del 2019	R13/ N5	3
Debe permitirle al usuario el control de 2 estados, encendido y apagado	R3/ N8	2
Debe contar con un control manual de la exposición del haz de luz sobre las muestras.	R8/ N2	4
El sistema debe poseer movimiento de la placa porta objetos para el direccionamiento del haz de luz	R18 / N1	4
El dispositivo debe cumplir con el artículo 10 numeral b y el artículo 11 párrafo 3 de la resolución 2115 del 2007	R16 / N7	2

Figura 7.8: Evaluación de criterios con respecto a la relación con los requerimientos establecidos en la figura 7.3 para el sistema de iluminación (Elaboración propia).

A partir de la figura 6.3 en donde se establece la escala de evaluación dependiendo de la relación entre los criterios y los requerimientos, cada criterio recibe un peso en función de su importancia con respecto a los requerimientos y su nivel de prioridad. Esta evaluación se refleja en la figura 7.9.

Matriz de decisión del sistema de iluminación			
	Sistema de iluminación		
Criterios (Requerimientos) / Materiales	Sistema 1 / Prototipo 1	Sistema 2 / Prototipo 2	Sistema 3 / Prototipo 3 y Prototipo 4
Debe producir un <u>mínimo</u> de 100 a 1000 lumens de potencia según la norma ISO 9345 del 2019	3	3	3
Debe permitirle al usuario el control de 2 estados, encendido y apagado	2	2	2
Debe contar con un control manual de la exposición del haz de luz sobre las muestras.	0	0	4
El sistema debe poseer movimiento de la placa porta objetos para el direccionamiento del haz de luz	0	4	4
El dispositivo debe cumplir con el artículo 10 numeral b y el artículo 11 párrafo 3 de la resolución 2115 del 2007	0	0	2
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>15</b>

Figura 7.9: Evaluación del sistema de iluminación (Elaboración propia).

En la figura 7.10 presenta la evaluación detallada de los 3 sistemas de iluminación desarrollados con respeto a cada criterio. Cada uno de estos se evalúa considerando su relación con respecto a cada criterio y se le asigna un peso según lo establecido en la figura 7.9.

Como resultado de este proceso de evaluación y selección, se obtiene un puntaje para cada sistema de iluminación en función de su cumplimiento con los criterios y requerimientos. En este caso el sistema con mayor puntaje fue el sistema 3 con un puntaje máximo de 15 puntos siendo el seleccionado para la construcción del sistema de iluminación del dispositivo, ya que cumple de manera óptima con todos los criterios y requerimientos establecidos.

Este proceso garantiza una selección fundamentada del sistema de iluminación el cual se ajusta perfectamente a las necesidades y criterios específicos del proyecto.

## **6. Diseño y construcción del dispositivo**

### **1. Sistema de enfoque**

***Sistema 1:*** De acuerdo al cumplimiento de construcción de dispositivos de aumento para visualización microscópica, con el que se comercializa el dispositivo carson micro flip de 100x-250x, establece un sistema de enfoque modificando la distancia focal entre los lentes que componen el sistema, por medio de un sistema de perilla, a partir de sus medidas y funcionamiento se diseña un sistema de fijación de 2 bandejas con un pivote ajustable para regular la distancia entre el lente ocular y la lámina portaobjetos.

Este sistema, como parte integral de un proceso de caracterización de prototipos, incorpora un sistema de enfoque acoplado al tubo que conecta ambos lentes. Teóricamente, se estima que puede lograr un aumento máximo de hasta 250x, según la información proporcionada en su ficha técnica (CARSON, 2021). Además, está equipado con un sistema de iluminación LED integrado en el dispositivo, que ofrece un control de dos niveles de intensidad lumínica, así como un sistema de luz UV. Esto permite su utilización en un amplio rango de aplicaciones sin restricciones

específicas. Para ver los planos consulte el anexo 3.

**Sistema 2:** Para asegurar el cumplimiento de las especificaciones de distancia focal, se realizan ajustes en el cuerpo del Carson Micro Flip. Se determina que el lente objetivo que se encuentra en el Carson no proporciona un aumento suficiente para alcanzar la resolución deseada en el sistema de lentes. Por lo tanto, se requiere adaptar una montura RMS de 20 mm para lograr una mejora en la resolución del sistema de lentes. En este sistema, se mantiene la estructura de bandejas con distancias fijas interconectadas mediante columnas en cuatro puntos de sujeción.

La incorporación de un lente objetivo de 100x y su adaptación proporcionan a este sistema una notoria mejora en la capacidad resolutive del conjunto de lentes. Sin embargo, es importante destacar que el sistema de sujeción a la bandeja superior (C), se ajusta mediante un solo punto a través de un mecanismo de pivote, manteniendo, no obstante, el sistema de elevación y la posibilidad de variar las distancias entre los lentes que conforman el sistema de enfoque de manera manual, girando el tubo que unifica los 2 lentes. Para ver los planos consulte el anexo 4.

**Sistema 3:** De acuerdo a lo establecido en la norma ISO 9345 del 2019 se adapta una montura RMS para los lentes objetivos comerciales siendo esta de diámetro interno fijo de 1.654 mm, en conjunto con este requerimiento se establece la distancia focal mínima a cumplir entre el lente objetivo y el lente ocular, estableciendo una distancia focal de 160



mm con un margen de error de 1.99 mm, esto con el fin de asegurar una correcta proyección de la imagen entre el elemento observable en la lámina portaobjetos y el lente ocular.

Este diseño se compone de 2 estructuras, las cuales se acoplan por medio de un sistema de tornillo-tuerca, este sistema varía la distancia entre la bandeja porta objetos y el lente objetivo por medio de un mecanismo manual de tornillo cresta en punta de 8 mm con su tuerca correspondiente el cual al generar un movimiento a un disco acoplado al tornillo, genera un movimiento comunicado entre el eje X al eje Y, este sistema depende directamente de una alineación entre el lente objetivo y la bandeja porta objetos.

En este sistema se tiene como objetivo variar la distancia de las muestras al complejo de lentes, unificando el sistema de enfoque con el de iluminación, estableciendo una función específica al complejo de lentes. Para ver los planos consulte el anexo 5.

**Sistema 4:** De acuerdo a lo establecido en la norma ISO 9345 del 2019 se adapta una montura RMS para los lentes objetivos comerciales siendo esta de diámetro interno fijo de 20 mm, en conjunto con este requerimiento se establece la distancia focal mínima a cumplir entre el lente objetivo y el lente de enfoque ocular, estableciendo una distancia focal de 160 mm con un margen de error de 1.99 mm, esto con el fin de asegurar una correcta proyección de la imagen entre el elemento obser-

vable en la lámina portaobjetos y el lente ocular.

Este diseño está compuesto por una estructura unificada entre el sistema que regula la distancia focal entre la bandeja porta objetos, el lente objetivo y el sistema de iluminación, permitiendo un movimiento más controlado y preciso, el movimiento se da por medio del giro manual de una perilla que está conectada a un tornillo sin fin de 4 hilos cresta rectangular de 8 mm, sostenido por rodamientos de 22 mm en la parte superior e inferior, y 2 varillas lisas de pivote separadas simétricamente para que los rodamientos lineales tengan un movimiento controlado, preciso y delicado. Para ver los planos consulte el anexo 6.

La unificación de los sistemas establece una relación entre robustez y funcionalidad, logrando una mayor compacidad en sus componentes y simplificando su complejidad para un funcionamiento más específico y eficiente.

Como resultado de la fase de diseño y construcción, se concluye que el Sistema 4 es el que mejor satisface los requisitos del diseño preliminar. Por lo tanto, se procede a seleccionarlo en la etapa de desarrollo de prototipos a escala real, considerando su capacidad para lograr un movimiento de enfoque suave y preciso, así como su excelente acoplamiento con otros sistemas. Esto se traduce en una mayor estabilidad y facilidad de uso del dispositivo final.

## **2. Sistema de iluminación.**

Para el desarrollo del sistema de iluminación, partimos de una estructuración sistemática de las posibles soluciones que le den cumplimiento a los requerimientos que pertenecen a este sistema, contemplando 3 sistemas de iluminación y seleccionando según su prototipo a escala real, el que mejor desempeñe sus funciones. Estableciendo el siguiente resultado :

Sistema de iluminación 1: Este sistema está compuesto de una carcasa de 10 x 10 x 10 cm, con un led de krypton de 700 Lumens, alimentado por una batería de 9v y con un circuito de control de potencia en 2 estados, cuenta con un interruptor de encendido y apagado, cuenta con un sistema giratorio con diferentes aberturas para regular la exposición de la placa portaobjetos. Para ver mejor consulte el anexo 2.

Sistema de iluminación 2: Compuesto de una carcasa de 10 x 10 x 10 cm, con un led de krypton de 700 Lumens, alimentado por una batería de 9v y con un circuito de control de potencia en 2 estados, cuenta con un interruptor de encendido y apagado, cuenta con un obturador fijo para regular la exposición del haz de luz a la placa portaobjetos. Para ver mejor consulte el anexo 3.

Sistema de iluminación 3 : Compuesto de una carcasa de 10 x 10 x 10 cm, con un led de krypton de 700 Lumens, alimentado por una batería

de 9v y con un circuito de control de potencia en 2 estados, cuenta con un interruptor de encendido y apagado, cuenta con un obturador regulable para controlar la exposición del haz de luz a la placa portaobjetos. Para ver mejor consulte el anexo 6.

El sistema de iluminación se elige siguiendo los criterios de evaluación detallados en la sección de metodología. Con base en estos criterios, se opta por el sistema de iluminación 3. Esto se debe a que este sistema incorpora una característica distintiva: un obturador regulable. Esta característica permite añadir funcionalidad adicional al sistema de enfoque, ya que permite enfocar, ajustar y controlar el haz de luz de manera precisa, lo que mejora significativamente su versatilidad y capacidad de regulación.

### **3. Etapa de prototipado.**

#### ***Prototipo 1:***

Este prototipo se diseña, cumpliendo los requisitos del sistema de iluminación, movimiento de las muestras y enfoque, adaptando la tecnología de un accesorio llamado micro flip de la marca carson con un aumento base de 150-250X, este prototipo se diseña bajo las condiciones de iluminación y requerimientos dados por el carson microflex, su sistema de fijación es por medio de una cuña que sujeta el cuerpo del microflex en una abertura diseñada para su sujeción, este sistema le pro-

porciona una adaptación de distancia de manera manual, este prototipo cuenta con un sistema de iluminación alimentado por una batería de 3.5v a un foco LED de luz fría el cual concentra el haz de luz por medio de un diafragma adaptado al tamaño de la bandeja inferior de iluminación, del mismo modo cuenta con un accesorio de encaje para asegurar la cámara de un dispositivo móvil al lente ocular del sistema.

Resultado:

Tabla 7.1: Detalle de componentes y costos prototipo 1

Componente (Material)	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario (\$)	Total (\$)
Bandeja 1 en PLA	gr	46	800	36,800
Bandeja 2 en PLA	gr	70	800	56,000
Axis de 2 planos	UNIDAD	1	63,209	63,209
LED	UNIDAD	1	98,770	98,770
Batería	UNIDAD	1	40,000	40,000
Disco en Acrílico para Obturador	cm <sup>2</sup>	3	1,200	3,600
Tornillos R4	UNIDAD	4	2,971	11,884
Estaño	gr	10	52,58	525,8
Tornillo R8	UNIDAD	1	3,324	3,324
Carson Micro Flip	UNIDAD	1	146,990	146,990
Switch	UNIDAD	1	400	400
Soportes	UNIDAD	4	800	2,400
Carcasa Inferior en PLA	gr	54	800	43,200
<b>Total</b>				532,308

En la construcción de este dispositivo se destaca la importancia del carson micro flip ya que al ser una tecnología comercial que promete un

aumento de 2500X es necesario medir su capacidad resolutive, accediendo a los planos del dispositivo fue posible adaptarlo a los requerimientos del proyecto, usando principalmente el PLA para construir la estructura vista en el plano del dispositivo 1.

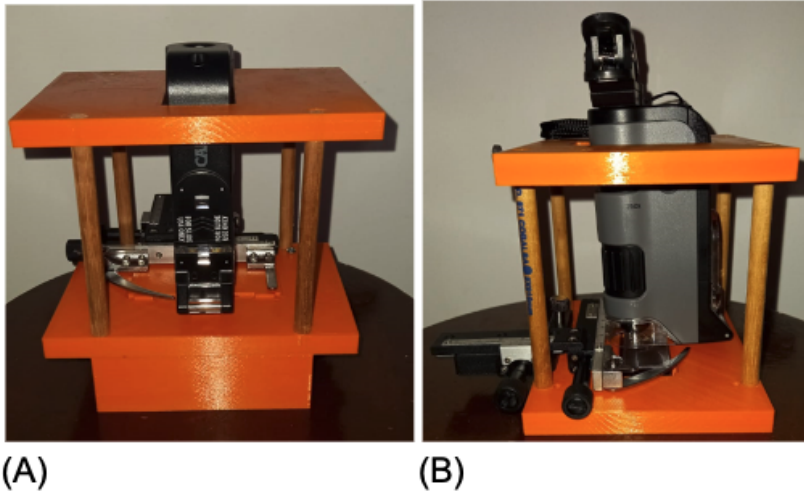


Figura 7.10: (A) Prototipo 1 con sistema de iluminación acoplado. (B) Prototipo 1 sin sistema de iluminación acoplado.

A partir de los resultados obtenidos durante la construcción del prototipo, se lleva a cabo una evaluación de su rendimiento en términos de capacidad resolutive y manipulación de la muestra utilizando un microorganismo con características morfométricas similares. Este microorganismo pertenece al género de las algas verdes unicelulares del filo Chlorophyta, presenta una forma esférica y carece de flagelos, con un tamaño que varía entre 2 y 10 micrómetros. Su color verde se debe a la

presencia de altos niveles de clorofila alfa y beta. La Chlorella, según Tanaka en 1990, cumple con los requisitos necesarios para determinar si es posible o no observar *Cryptosporidium* spp. utilizando este prototipo, obteniendo los siguientes resultados:

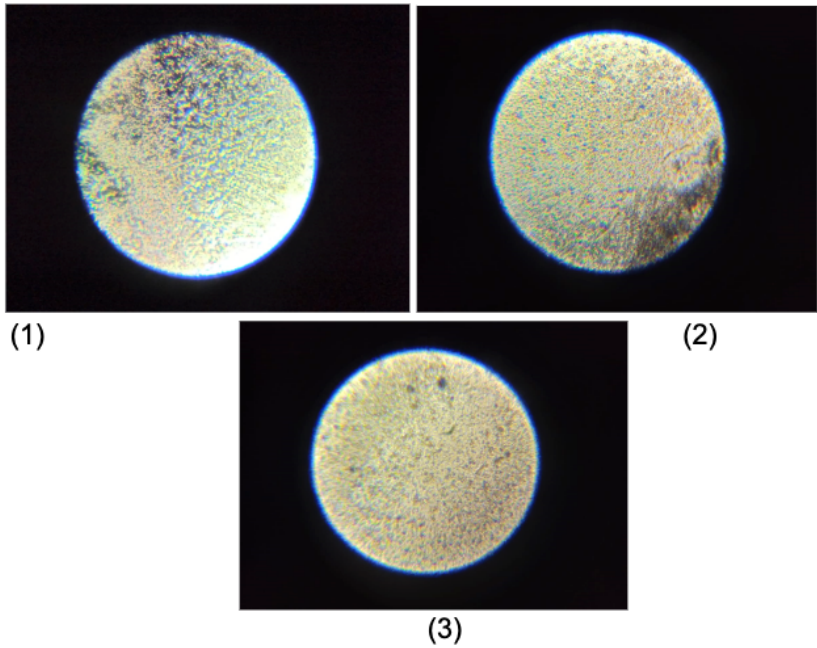


Figura 7.11: (1) Visualización de muestra de Chlorella a 100 x . (2) Visualización de muestra de Chlorella a 200 x . (3) Visualización de muestra de Chlorella a 250 x

Los resultados obtenidos de este prototipo, dan como resultado las siguientes oportunidades de mejora:

- El material de construcción del tubo de unión entre el lente objetivo y el lente ocular es poroso, permitiendo que pase contaminación lumínica al interior del tubo, provocando una distorsión de la imagen.
- El sistema de corredera - pestaña, genera que al mover el tubo, se den muchas vibraciones indeseadas, desenfocando la muestra y demorando mucho tiempo en estabilizarse.
- La batería no se alimenta por el tiempo suficiente.
- El complejo de lentes no le permite la resolución suficiente para identificar estructuras de las muestras con tamaños menores a 10  $\mu\text{m}$

### ***Prototipo 2:***

Entendiendo las necesidades para mejorar el prototipo 1, se evaluó el uso de una pieza construida en impresión 3D para adaptarla al micro flip, con el objetivo de proporcionar un movimiento manual y controlado para definir la distancia focal entre el complejo de lentes y las muestras de acuerdo a la ecuación 1 encontrada en metodología. Al utilizar estas dos piezas, se logra extender la longitud original del micro flip y aumentar el tamaño total del prototipo a 16 cm de largo, de los cuales solo 8 cm pertenecen a la pieza (a). La ampliación total es de 12cm y al utilizar el sistema de enfoque integrado con la pieza (b), se obtiene un rango de



movimiento de 4cm en el eje Y, permitiendo acercar y alejar el lente objetivo de las muestras. El sistema funciona mediante un diseño adaptado de corredera-pestaña, donde al girar el tubo que soporta al lente objetivo, este tubo tiene adaptada la pieza (b) en su extremo superior, permitiendo que las correderas le den la guía hacia arriba y abajo para generar que la pieza (a) genere el movimiento necesario para el enfoque.

Tabla 7.2: Detalle de componentes y costos prototipo 2

Componente (Material)	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario (\$)	Total (\$)
Bandeja 1 en PLA	gr	46	800	36,800
Bandeja 2 en PLA	gr	70	800	56,000
Axis de 2 planos	UNIDAD	1	63,209	63,209
LED	UNIDAD	1	98,770	98,770
Batería	UNIDAD	1	40,000	40,000
Condensador	UNIDAD	1	220,000	220,000
Tornillos R4	UNIDAD	4	2,971	11,884
Estaño	gr	10	52,58	525,8
Tornillo R8	UNIDAD	1	3,324	3,324
Carson Micro Flip	UNIDAD	1	146,990	146,990
Switch	UNIDAD	1	400	400
Soportes	UNIDAD	4	800	2,400
Carcasa Inferior en PLA	gr	54	800	43,200
Tubo de Acero de ¾ “ Gal- vanizado	Mt	1	29,000	29,000
Mano de Obra	HORA	3	25,000	75,000
Lente de 100X	UNIDAD	1	365,273	365,273
Carson Micro Flip	UNIDAD	1	146,990	146,990
<b>Total</b>				1,045,786

Aplicando las oportunidades de mejora del prototipo 1, se generan cambios en el tamaño entre el prototipo 1 y 2, dando como resultado una altura de 16 centímetros, adaptando el carson microflex a las piezas diseñadas, obteniendo el siguiente resultado:

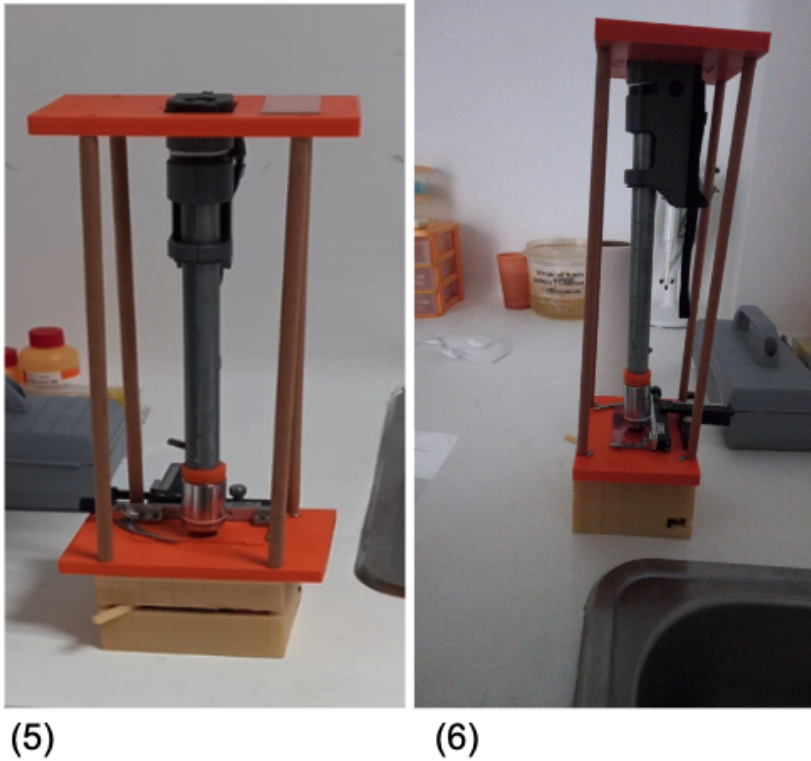


Figura 7.12: (5) Adaptación de extensión de tubo con montura RMS vista frontal. (6) Adaptación de extensión de tubo con montura RMS vista lateral.

A partir de los resultados obtenidos durante la construcción del pro-

totipo 2, se lleva a cabo una evaluación de su rendimiento en términos de capacidad resolutive y manipulación de la muestra utilizando una muestra de células sanguíneas fijadas como controles de microscopía en donde gracias a un proceso de tinción similar al requerido por *Cryptosporidium* spp. Gracias al tamaño y forma de algunas de las células sanguíneas, cumple con los requisitos necesarios para determinar si es posible o no observar *Cryptosporidium* spp. utilizando este prototipo, obteniendo los siguientes resultados:

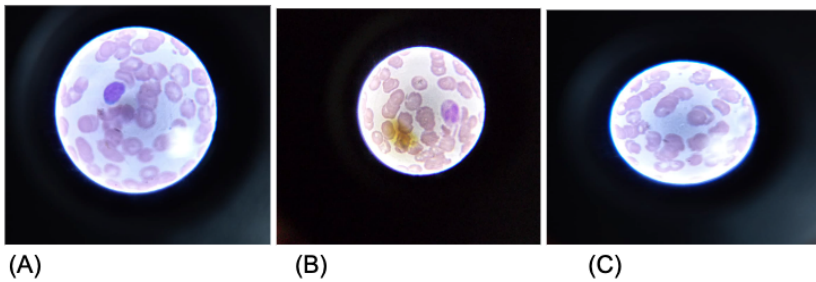


Figura 7.13: (A) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x y modo de iluminación tenue. (B) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x. y modo de iluminación media. (C) Visualización de extendido sanguíneo con tinción de Giemsa usando un lente objetivo de 100x y modo de iluminación Alta.

Los resultados obtenidos de este prototipo, dan como resultado las siguientes oportunidades de mejora:

- El sistema de corredera - pestaña de la pieza (4), genera que al mover el tubo, se den muchas vibraciones indeseadas, desenfocando la muestra y demorando mucho tiempo en estabilizarse.
- Mayor robustez debido a sus cambios de tamaño.
- El sistema de enfoque implementado agrega mayor peso al soporte del carson microflex, generando que exista movimiento de manera involuntaria.
- El lente ocular no permite una correcta identificación de estructuras debido a su baja capacidad de aumento.

### ***Prototipo 3:***

Para el diseño del prototipo 3 se requiere tener en cuenta las oportunidades de mejora mencionadas en cada prototipo anterior con el fin de dar una solución fundamentada en un proceso de iteración desde la ingeniería, fundamentando un cambio de sistema de enfoque, permitiendo reestructurar la conjugación de los lentes con el fin de establecer el aumento requerido y la estabilidad necesaria para lograr observar correctamente las muestras, logrando adquirir fotografías en donde se identifiquen estructuras y organelos del microorganismo observado.

Tabla 7.3: Detalle de componentes y costos prototipo 3

Componente (Material)	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario (\$)	Total (\$)
Bandeja 1 en PLA	gr	46	800	36,800
Acople para Dispositivos Móviles	UNIDAD	1	30,991	30,991
Carcasa de Lentes en PLA	gr	120	800	96,000
Axis de 2 Planos	UNIDAD	1	63,209	63,209
LED	UNIDAD	1	98,770	98,770
Batería	UNIDAD	1	40,000	40,000
Condensador	UNIDAD	1	220,000	220,000
Tornillos R4	UNIDAD	4	2,971	11,884
Estaño	gr	10	52,58	525,8
Lente de 100X	UNIDAD	1	365,273	365,273
Lente de 10X	UNIDAD	1	220,000	220,000
Switch	UNIDAD	1	400	400
Carcasa Externa	gr	170	1,200	204,000
Carcasa Inferior en PLA	gr	54	800	43,200
Tornillo Sin Fin de 8 mm	Mt	1	15,000	15,000
Cresta Triangular				
Mano de Obra	HORA	3	25,000	75,000
<b>Total</b>				1,521,052

En la selección del tipo de tornillo se calcula la relación mecánica tipo tornillo, donde se tiene el dato de lograr una relación de movimiento de 1 : 1, es decir, que lo que se mueva el tornillo, se mueva la tuerca, generando el desplazamiento deseado. Por ende, es necesario conocer la carga a la que estará expuesto el tornillo, convirtiendo la masa del sistema de iluminación a  $\frac{\text{kg}}{\text{mm}^2}$ , teniendo en cuenta que 1 Kg es igual a

1 Kgf, usando la siguiente ecuación:

$$F = m \cdot g$$

Donde:

$F$  = fuerza dada en Newtons

$m$  = masa

$g = 9,8 \text{ m/s}^2$

Para el uso de la ecuación anterior, tenemos que  $m = 1,6 \text{ kg}$  y  $g = 9,8 \text{ m/s}^2$ , arrojando como resultado que la fuerza a la que estará sometido el sistema de tuerca-tornillo es de  $15,68 \text{ N}$ . Esto permite establecer que, de acuerdo a esta carga, los tornillos y tuercas ideales para construir el mecanismo serán materiales como acero bajo en carbono, lo suficientemente fuertes para resistir la carga.

Para la selección del calibre del tornillo, se hace uso de la tabla de resistencia de pernos vista en (Gonzales, 2019), identificando que los calibres ideales son desde  $1/8''$  hasta  $7/16''$ , brindando una amplia selección. Se decide por el calibre de  $5/16''$ , que es igual a un tornillo con diámetro de 8 milímetros con paso de rosca fina de 1,25 milímetros, encontrado comercialmente como  $M8$ .

Para conocer la relación que se tiene en el desplazamiento lineal de la tuerca con relación a su tornillo, se usa la siguiente fórmula:

$$d = \theta \cdot p$$

Donde:

$d$  = desplazamiento lineal

$\theta$  = ángulo de rotación en radianes

$p$  = paso del tornillo

Se tiene en cuenta el cálculo por cada grado de rotación que se genera de forma manual al girar la muñeca, teniendo un rango de  $90^\circ$  por pronación y  $90^\circ$  por supinación, teniendo un total de  $180^\circ$  (Carlos, 2016). Al conocer esto, al hacer uso de la anterior ecuación, se tiene el siguiente resultado:

Cálculo por grado:

$$d = 0,0174 \cdot 1 \cdot 1,25$$

$$d = 0,0217 \text{ mm}$$

Logrando entonces que al girar la perilla conectada al tornillo, se obtendrá un movimiento lineal de elevación y descenso de  $0,0217 \text{ mm/}^\circ$ .

Este prototipo genera un nuevo concepto de mejora e iteración, logrando mostrar lo siguiente:

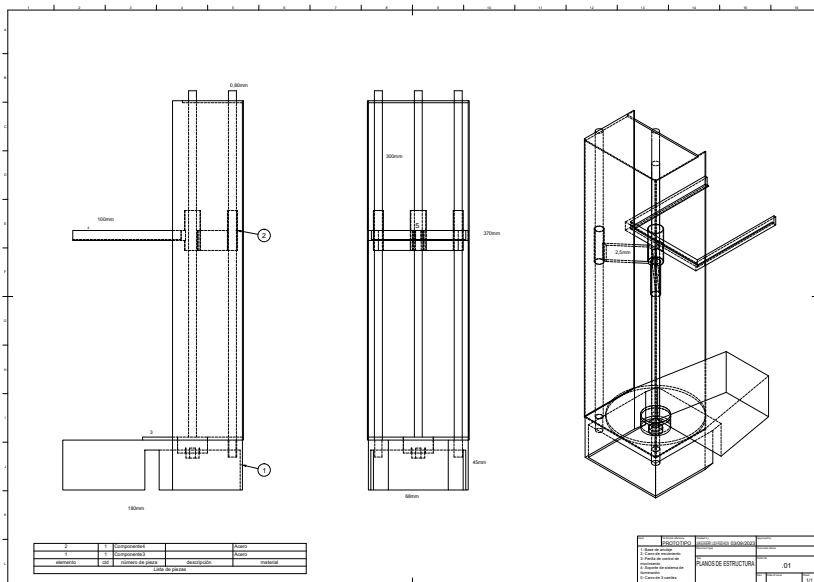


Figura 7.14: Estructura principal prototipo 3 (Elaboración propia) para ver mejor consulte el anexo 5.

Como se puede apreciar, este prototipo, a pesar de haber unificado el sistema de enfoque, aún requiere de otros componentes específicos, como se ilustra en la imagen anterior. Estas piezas, conocidas como Pieza 1 y Pieza 2, se integran al mecanismo de tuerca-tornillo, lo que permite



que el desplazamiento del disco (Pieza 1) genere una variación en la distancia entre el conjunto de lentes y las muestras. Este principio, resultó ser el aspecto más desafiante de evaluar.

A partir de los resultados obtenidos durante la construcción del prototipo 3, se lleva a cabo una evaluación de su rendimiento en términos de capacidad resolutive y manipulación de la muestra utilizando un microorganismo con características morfométricas similares. Este microorganismo pertenece al género de las algas verdes unicelulares del filo Chlorophyta, presenta una forma esférica y carece de flagelos, con un tamaño que varía entre 2 y 10 micrómetros. Su color verde se debe a la presencia de altos niveles de clorofila alfa y beta. La *Chlorella*, según Tanaka en 1990, cumple con los requisitos necesarios para determinar si es posible o no observar *Cryptosporidium* spp. utilizando este prototipo, obteniendo los siguientes resultados:

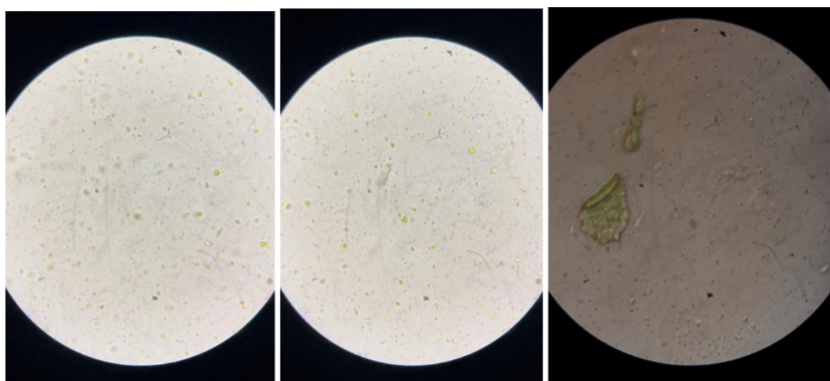


Figura 7.15: Resultados de observación de Chlorella con una conjugación de lentes de 1000x y un sistema de iluminación regulable manualmente.

A partir de los resultados obtenidos de este prototipo, dan como resultado las siguientes oportunidades de mejora:

- El sistema de carro porta bandejas, genera que al mover el disco de desplazamiento no se pueda dar un enfoque controlado debido a vibraciones transmitidas por el cuerpo del dispositivo, generando un mayor desgaste para lograr la estabilización del sistema.
- Mayor peso debido a la construcción con un nuevo material de construcción.
- Menor tamaño debido a las nuevas proporciones de los implementos usados para lograr el mecanismo de enfoque.

#### ***Prototipo 4:***

Como resultado del proceso de mejora de los 3 prototipos anteriores, el sistema de enfoque es mejorado por un sistema de movimiento de perilla manual, el cual genera en el eje Y, la elevación del sistema de iluminación en conjunto con la bandeja porta objetos, acoplada al sistema de iluminación, generando la unificación entre sistemas, usando en el sistema de enfoque un tipo de supresión de vibraciones y mayor acople entre los elementos que componen cada sistema, obteniendo el siguiente resultado:

Tabla 7.4: Detalle de componentes y costos prototipo 4

Componente (Material)	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario (\$)	Total (\$)
Bandeja 1 en PLA	gr	46	800	36,800
Acople para Dispositivos Móviles	UNIDAD	1	30,991	30,991
Carcasa de Lentes en PLA	gr	30	800	24,000
Axis de 2 Planos	UNIDAD	1	63,209	63,209
LED	UNIDAD	1	98,770	98,770
Batería	UNIDAD	1	40,000	40,000
Condensador	UNIDAD	1	220,000	220,000
Tornillos R4	UNIDAD	4	2,971	11,884
Estaño	gr	10	52,58	525,8
Lente de 100X	UNIDAD	1	365,273	365,273
Lente de 10X	UNIDAD	1	220,000	220,000
Switch	UNIDAD	1	400	400
Acrílico	mt2	1.8	59,388	106,898
Carcasa Inferior en PLA	gr	54	800	43,200
Tornillo Trapezoidal sin Cresta	Mt	1	37,000	37,000
Fin 4 Hilos de 8mm Cuadrada				
Tuerca de 8mm 4 Hilos	UNIDAD	1	52,800	52,800
Rodamientos Lineales	UNIDAD	4	28,200	112,800
Perilla en Resina	UNIDAD	1	23,000	23,000
Eje para Perilla	UNIDAD	1	5,400	5,400
Soportes de Aluminio (Varillas)	Mt	2	26,000	52,000
Acople Flexible	UNIDAD	1	12,122	12,122
Corte Laser	Minuto	30	1,200	36,000
Mano de Obra	Hora	1	25,000	25,000
<b>Total</b>				1,661,072



Figura 7.16: Estructura principal del sistema de enfoque del prototipo 4. Para la construcción de este dispositivo se tuvo en cuenta que, bajo los cálculos elaborados en el dispositivo 3 y evaluando el resultado obtenido, el sistema de enfoque de tornillo-tuerca presenta que al tener una cresta rectangular, entre la tuerca y el tornillo queda un espacio lo suficientemente grande para ocasionar cabeceos que se definen como ruidos en el sistema de visualización. Por ende, es necesario optar por una alternativa más específica, aplicando los sistemas de CNC al sistema de enfoque, reemplazando el tornillo M8 rosca fina comercial por un tornillo de 8 milímetros de 4 hilos cresta rectangular con paso de 1,00 mm, la

cual disminuye el espacio entre las estrías de la tuerca y las crestas del tornillo, con el fin de lograr un movimiento más suave, disminuyendo el ruido encontrado por movimiento y permitiendo enfocar de manera precisa las muestras contenidas en las láminas.

Para conocer la relación que se tiene en el desplazamiento lineal de la tuerca con relación a su tornillo, se usa la siguiente fórmula:

$$d = \theta \cdot p$$

Donde:

$d$  = desplazamiento lineal

$\theta$  = ángulo de rotación en radianes

$p$  = paso del tornillo

Teniendo en cuenta lo mencionado en el dispositivo 3 y aplicando el mismo cálculo, se obtiene que:

$$d = 0,0174 \cdot 1 \cdot 1,00 = 0,0174 \text{ mm}$$

Logrando de esta manera que el movimiento de elevación y descenso por grado de rotación de la muñeca sea de 0,01 mm, reconociendo una notable mejora en el momento de enfocar las muestras, regulando así, la distancia anteriormente mencionada del sistema de lentes y el sistema de iluminación que contienen las láminas con las muestras.

Este sistema de movimiento en la bandeja portaobjetos ofrece un control más preciso sobre la variabilidad en la distancia entre el conjunto de lentes y las muestras. Esto permite mitigar las vibraciones excesivas y resulta en una calidad de enfoque superior. La robustez y el material de construcción de este prototipo le proporcionan la capacidad de mantenerse estable en superficies planas, al mismo tiempo que reduce la interferencia de vibraciones y la contaminación lumínica ambiental.

El éxito de este prototipo ha llevado a la identificación de una lista de componentes clave que contribuyen a la repetibilidad del proceso de construcción y a la evaluación de los resultados obtenidos al integrar todos los sistemas en un único dispositivo final.

#### ***Lista de componentes del prototipo 4***

CROQUIS	NOMBRE	FUNCION
	<p>SISTEMA DE ILUMINACIÓN Y ANCLAJE DE MUESTRAS</p>	<p>Es la encargada de dar soporte al Axis y las placas que contienen las muestras con el fin de dejar pasar por su orificio central, el haz de luz regulado de manera manual dirigida del sistema de iluminación</p>
	<p>TUERCA MILIMETRICA DE 8 MM</p>	<p>Es la encargada de transformar el movimiento mecánico ejercido en la perilla de movimiento manual en la elevación y descenso de la bandeja que soporta el sistema de iluminación.</p>
	<p>AXIS DE MOVIMIENTO</p>	<p>Es la encargada de permitir el movimiento milimétrico de las placas porta objetos, esta pieza se sujeta de la cara superior de la Bandeja Inferior Porta objetos.</p>



CROQUIS	NOMBRE	FUNCION
	ESTRUCTURA PRINCIPAL	<p>Esta pieza es la encargada de unificar todos los sistemas, brindando la robustez y área de sustentación necesaria para soportar todos los componentes, esta pieza le da soporte a las varillas de anclaje y al tornillo milimetrico para permitirle el movimiento al carro del eje Y.</p>
	LENTE OCULAR	<p>Esta pieza es la encargada de Magnificar en aumentos, la imagen obtenida desde el lente ocular, esta pieza hace parte del sistema de enfoque, siendo el punto de donde se adquieren las imágenes de las muestras.</p>
	LENTE OBJETIVO	<p>Esta pieza es la encargada de darle los primeros aumentos a las muestras observadas, es la pieza más cercana a la bandeja inferior y gracias a esta, es <u>posible</u> ver los detalles microscópicos de las muestras colocadas en las placas portaobjetos.</p>

CROQUIS	NOMBRE	FUNCION
	TORNILLOS M3	Son los encargados de fijar las bandejas en sus respectivas carcasas.
	VARILLA LISA DE ANCLAJE PARA RODAMIENTOS LINEALES	Esta pieza es la encargada de darle el soporte de ancla a la bandeja que contiene los rodamientos lineales de 8 mm para lograr el movimiento de elevación en el eje Y, este sistema hace parte del sistema de enfoque.
	TORNILLO CRESTA CUADRADA 4 HILOS	Esta pieza de 8mm de enroscado milimétrico cuadrado, es la guía por donde la bandeja que transporta el sistema de iluminación y la bandeja inferior porta objetos, permite el movimiento en el Eje Y, siendo este la clave para permitir la sintonía entre el sistema de enfoque y el sistema de iluminación con el fin de permitir una visualización con alta resolución de las muestras.

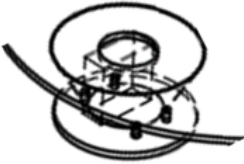
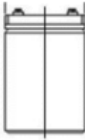
CROQUIS	NOMBRE	FUNCION
	BOMBILLA LED	Este componente es el encargado de emitir el haz de luz, alimentado por una Batería de 3.5V es capaz de generar un espectro de luz visible entre los 450 a los 780 nm, este componente se acopla a la carcasa del sistema de iluminación y se alinea con la apertura en el centro del cuerpo de la bandeja inferior porta objetos
	BATERÍA	Este componente le brinda la alimentación eléctrica necesaria para el funcionamiento de la bombilla LED con el fin de producir el haz de luz necesario para el funcionamiento del sistema de iluminación.

Figura 7.17: Componentes del prototipo 4

La fase final de construcción del dispositivo se enfocó en la integración de los sistemas que demostraron un rendimiento superior. Se determinó que el Sistema de Enfoque 4, el Sistema de Iluminación 3 y la utilización de acrílico como material de construcción obtuvieron las calificaciones más altas durante el proceso de evaluación descrito anteriormente.

En el caso del prototipo 4, se enfrentó el desafío de acoplar los sistemas de manera extremadamente precisa, ya que el margen de error de 1.29 mm no permite tolerancias significativas. Para abordar esta necesidad, se implementó un protocolo de corte láser en las láminas de

acrílico. Esto permitió establecer una simetría precisa al unir la estructura con acetona, definiendo cuidadosamente las superficies de contacto de acuerdo con los planos del dispositivo. El resultado final fue el siguiente:



( P1)

(P2)

Figura 7.18: Prototipo 4 sin montaje del sistema de iluminación y complejo de lentes. (P2) Prototipo 4 con sistemas acoplados.

A partir de los resultados obtenidos durante la construcción del prototipo 4, se lleva a cabo una evaluación de su rendimiento en términos de capacidad resolutive y manipulación de la muestra utilizando una muestra de *Cryptosporidium* spp. Evaluando el cumplimiento de los requisitos necesarios para determinar si es posible o no tener la resolución suficien-

te para identificar sus orgánelos y características únicas del microorganismo . utilizando este prototipo, obteniendo los siguientes resultados:



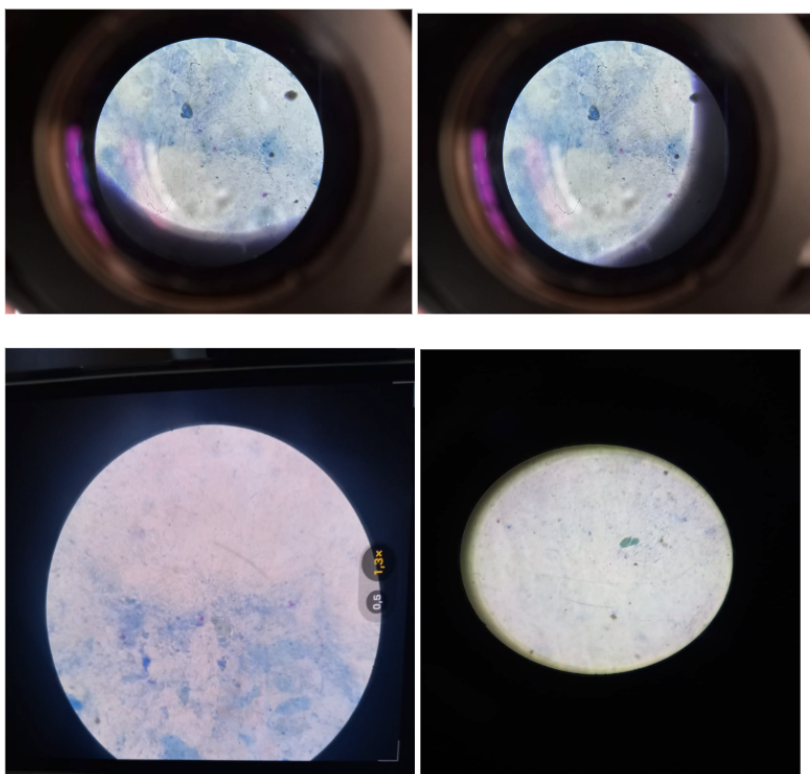


Figura 7.19: Observación de muestra de *Cryptosporidium* spp. en muestras con tinción de (ZN modificada)

Como parte integral del producto final, se definen las características de tamaño y peso que imponen restricciones en su construcción y desarrollo. Estas características se ajustan para cumplir con los requisitos funcionales establecidos, siguiendo los principios fundamentales de funcionamiento de un dispositivo de aumento microscópico, tal como se describe en la norma ISO 9345 de 2019. El objetivo es permitir una visualización precisa del microorganismo mediante el microscopio, alla-

nando el camino para la siguiente etapa: la toma de muestras.

## **Resultado de la fase 2:**

Preparación de las muestras:

### *a) Caracterización de las muestras de agua filtrada:*

Para la medición de la turbidez de las muestras, se ha utilizado un Turbidímetro Digital de HACH MODELO 2100P, para la medición del pH se utilizó un pH digital portátil marca Hanna, modelo HI 98130, para la medición de conductividad se usó un multiparámetro marca Hanna Instruments, modelo HI98309.



Figura 7.20: Medición de pH con Phmetro digital portátil Hanna HI98130 (Elaboración propia).



Figura 7.21: Medición de Turbidez con turbidímetro HACH 2100P (Elaboración propia).



Figura 7.22: Medición de conductividad con multiparámetro marca Hanna Instruments, modelo HI98194 (Elaboración propia).

Obteniendo los siguientes resultados:



Parámetro	Dato Teórico	Dato medido M1-M2	Dato medido M3-M4	Dato medido M5-M6	Dato medido M7-M8
pH	7-8.5	6.8	6.3	6.2	6.7
		7.3	6.5	6.9	7.0
Turbidez	0-5 NTU	0.76	1.01	1.05	0.98
		1.20	1.19	1.18	1.11
Conductividad	400-1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$	454.3	458.3	464.3	449.9
		480.9	485.9	479.9	482.9

Figura 7.23: Comparación de las mediciones de los diferentes parámetros según la muestra (Elaboración propia).

Según la figura 7.44. Se puede establecer una línea de tendencia según la muestra, siendo las siguientes agrupaciones el duplicado de cada una: M1: 1-2 M2: 3-4 M3: 5-6 M4: 7-8.

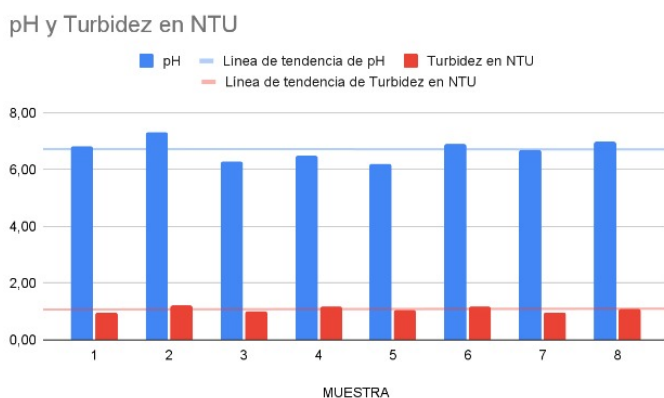


Figura 7.24: Mediciones de pH y turbidez por muestra (Elaboración propia).



Figura 7.25: Mediciones de conductividad dado en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  por muestra (Elaboración propia).

Gracias a las mediciones realizadas en el laboratorio y evidenciadas en los gráficos anteriores, podemos establecer lo siguiente:

- El valor promedio del pH es de 6.75.
- El valor promedio de turbidez es de 1.08.
- El valor promedio de conductividad es de 472.1.

Estos valores, al compararse con las expectativas establecidas por Darío Marín (2019), confirman que las muestras recolectadas cumplen con los estándares definidos. Esto significa que el agua recolectada durante el proceso de filtración puede utilizarse con seguridad en la prepa-

ración de las muestras en el laboratorio, tal como se detalla en la metodología de dilución que se discutió previamente.

*b) Preparación de las muestras*

Según lo descrito en la metodología se establece el siguiente patrón de rotulación:

- M - 10
- F.F = 04/11/2023

Contenido: Muestra de agua filtrada.

Teniendo un total de 8 tubos preparados, de 20 mL organizados de la siguiente manera: M1-10 Con preparación de 10 mL de solo agua filtrada, siendo este nuestro control negativo, M2-10<sup>-1</sup> con 9 mL de agua filtrada y 1 mL de muestra patrón de *Cryptosporidium* species de laboratorios microbiologics, M3-10<sup>-3</sup> preparada con 10 mL de agua filtrada y 0,1 mL de muestra del concentrado M2, M4-10<sup>-5</sup> con 9 mL de muestra de agua filtrada y 1 mL de muestra del concentrado M3, estableciendo un factor de dilución menos predecible y logrando establecer por duplicado las mismas condiciones para asegurar una evaluación integral y transparente, evitando sesgos por parte de la empresa contratante.

Se eligen 4 tubos, uno de cada muestra con el fin de procesarlos con el dispositivo de bajo costo, remitiendo al laboratorio de salud pública de Villavicencio, Meta los otros 4 tubos con el fin de establecer una evaluación de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua filtrada a diferentes concentraciones.

Teniendo un total de 8 tubos preparados, de 20 mL organizados de la siguiente manera: M1-10 Con preparación de 10 mL de solo agua filtrada, siendo este nuestro control negativo, M2- $10^{-1}$  con 9 mL de agua filtrada y 1 mL de muestra patrón de *Cryptosporidium* species de laboratorios microbiológicos, M3- $10^{-3}$  preparada con 10 mL de agua filtrada y 0,1 mL de muestra del concentrado M2, M4- $10^{-5}$  con 9 mL de muestra de agua filtrada y 1 mL de muestra del concentrado M3, estableciendo un factor de dilución menos predecible y logrando establecer por duplicado las mismas condiciones para asegurar una evaluación integral y transparente, evitando sesgos por parte de la empresa contratante.

Se eligen 4 tubos, uno de cada muestra con el fin de procesarlos con el dispositivo de bajo costo, remitiendo al laboratorio de salud pública de Villavicencio, Meta los otros 4 tubos con el fin de establecer una evaluación de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua filtrada a diferentes concentraciones.

*b) Tinción de las muestras:*

En el proceso de tinción, fue necesario realizar la compra de los reactivos para realizar la metodología de Ziehl Neelsen Modificada, gracias a esto fue posible obtener los siguientes resultados:

1. Etiquetar o identificar el portaobjetos: Se hace con marcador permanente una marquilla distiva en las láminas por medio de un consecutivo, empezando por 1 y terminando con 6, de la misma manera se marcan 2 láminas con las letras C.N (control negativo) siendo las placas 7 y 8.

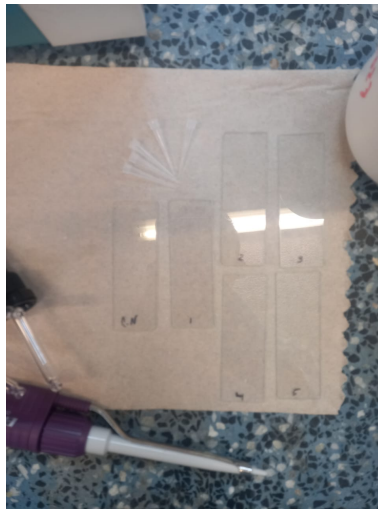


Figura 7.26: Marcación de láminas (Elaboración propia)

2. Tomar una porción pequeña de la muestra con ayuda de un aplicador o una micropipeta: Para este paso, con ayuda de una micropipeta con rango de volumen de 0.1-5  $\mu\text{L}$  se succiona una alícuota

de 0,1 *mu*L y se depositan sobre las láminas según la relación de concentración encontrada en el apartado metodológico.

3. Hacer una extensión fina sobre el portaobjetos: Con ayuda de la punta descartable de la micropipeta se realiza una extensión sobre la lámina porta objetos.
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Una vez seca, fijar la extensión con METANOL o bien aplicando calor con ayuda de un mechero (pasar el portaobjetos 2-3 veces sobre la llama de forma rápida para evitar que la muestra se queme) y dejar enfriar: Se realiza método de fijación por calor.
6. Cubrir la preparación con el reactivo FUCSINA FENICADA durante 5 minutos (toda la muestra quedará teñida de color rojo intenso).
7. Decolorar con ALCOHOL-ÁCIDO durante 20-30 segundos (los quistes AAR de estos parásitos intestinales no se decoloran, permaneciendo de color rojo-fucsia)
8. Lavar con AGUA.
9. Cubrir la preparación con el reactivo AZUL DE METILENO durante 30 segundos.
10. Lavar con AGUA. Los pasos del 2-10 se elaboraron según el manual, respetando los tiempos requeridos por los reactivos, logrando el siguiente resultado:

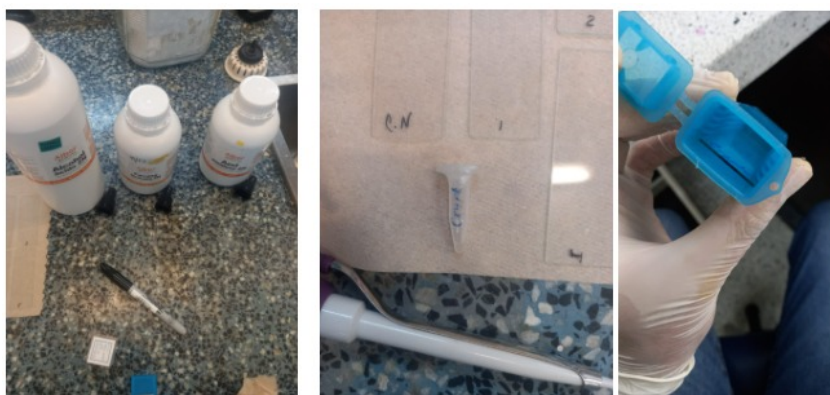


Figura 7.27: Mosaico de imágenes del proceso de tinción (Elaboración propia).

11. Secar la preparación y visualizar con un microscopio bajo el objetivo de 100x en aceite de inmersión.

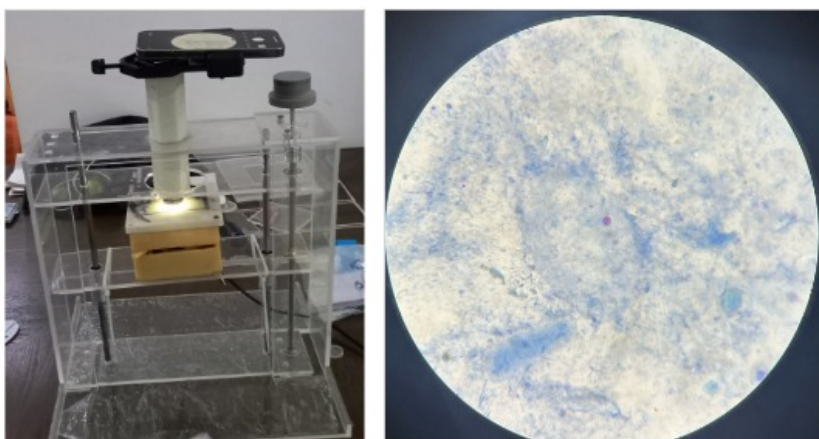
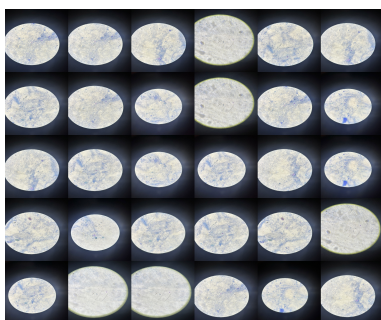


Figura 7.28: Mosaico de resultados obtenidos de las muestras teñidas con ZN modificada (Elaboración propia).

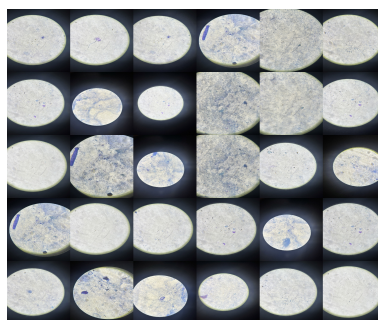
*c)Resultado del ordenamiento de la base de datos*

Como resultado del proceso de ordenamiento y procesamiento de imágenes, se ha diseñado un sistema que facilita la gestión de imágenes y la extracción de información relevante. El objetivo principal de este sistema es organizar y transformar un conjunto diverso de imágenes en un formato homogéneo, lo que permite un análisis más efectivo y una mayor eficiencia en la obtención de información.

A continuación se observan los resultados obtenidos en este punto:

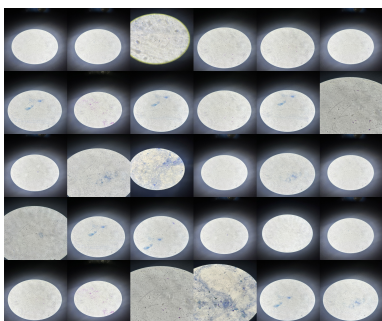


(a) Control positivo

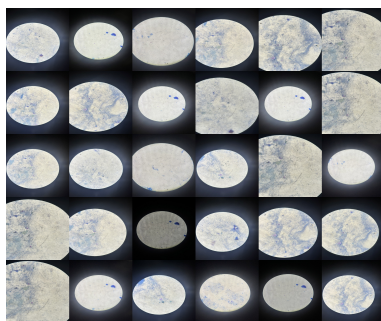


(b) Control negativo

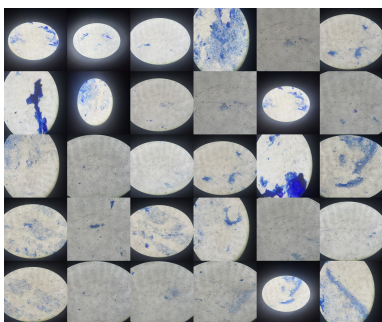




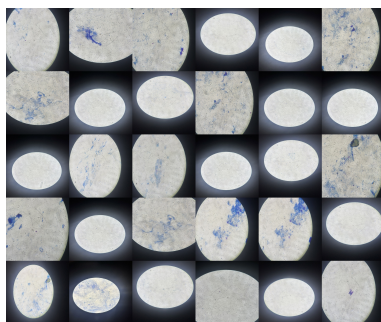
(a) Lamina 1



(b) Lamina 2



(a) Lamina 3



(b) Lamina 4

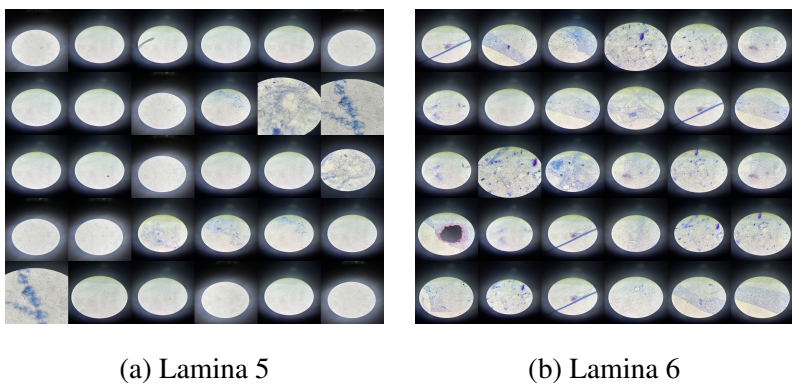


Figura 7.29: Resultado del ordenamiento de imagenes (Elaboración propia).

### **Resultado de la fase 3:**

Como resultado de la fase 3 tenemos el desarrollo de una solución tecnológica comprendida por 3 soluciones independientes:

La primera solución es un código de visión artificial que permite el reconocimiento del *cryptosporidium* spp. en muestras de agua, las cuales fueron preparadas previamente en laboratorio con la tinción de Ziehl neelsen modificada y que cumple con la función de detección de características específicas propias del *Cryptosporidium* spp., tales como: color, forma y tamaño, y con esto, realizar la identificación y cuantificación de los (oo)quistes presentes en la muestra analizada.

Para la segunda solución, tenemos una aplicación móvil, pensada para ser la interfaz que permita a los usuarios usar a demanda el software de visión artificial y validar las imágenes capturadas con el dispositivo portable desarrollado para el objetivo 1.

Finalmente, la tercera solución, es una aplicación web basada en Python, que permite la gestión de solicitudes http bajo arquitectura RESTful. Este desarrollo, alojado en la plataforma Python Anywhere nos brinda un servidor de bajo costo, disponible 24/7 y con unos recursos suficientes para gestionar las solicitudes realizadas por nuestro prototipo y algunos clientes más.

Los criterios de selección para la implementación de esta solución fueron:

- **Mantenibilidad del código de visión artificial:** El código fue creado con una de las librerías más populares del mundo para este tipo de necesidades. OpenCV, es una librería lanzada por Intel, de software libre y código abierto, que cuenta con una comunidad activa y que continuamente está brindando mejoras y actualizaciones. Al utilizar esta librería, estamos fomentando que un mayor porcentaje de investigadores pueda tomar este código generado y tomarlo como base o incluirlo en desarrollos similares o investigaciones relacionadas.

- Capacidad de adaptación del código de visión artificial para la fácil inclusión de otros microorganismos: Dado que el proceso de caracterización es replicable en otros microorganismos, y el código desarrollado cuenta con la facilidad suficiente para que puedan agregarse al nuevos parámetros de identificación y clasificación en un periodo relativamente corto de tiempo, y con ello aumentar la capacidad de reconocimiento de la solución de una manera ágil.
- Independencia de los sistemas: Dado que la aplicación no realiza directamente la validación, sino que por el contrario, usando servicios web consulta a un servidor con unos parámetros definidos, se puede pensar en brindar actualizaciones independientes de cada sistema, y solo manteniendo los parámetros de comunicación, al agregar las nuevas capacidades que puedan por ejemplo incluirse en el código de visión artificial, sin necesidad de tener que hacer una actualización sobre la aplicación móvil, o la aplicación web de ruteo de solicitudes.
- Escalabilidad de la solución: La solución utiliza una arquitectura de software donde las responsabilidades están claramente definidas y no existe una sesión por usuario, gracias a esto es posible plantear una arquitectura cliente - servidor (donde el celular es nuestro cliente y el servidor es nuestro aplicativo encargado de la lógica de reconocimiento). Dadas las características anteriores el servidor puede comportarse de una manera más independiente y podemos tomar ventaja del concepto de escalabilidad horizontal,

que permite la fácil inclusión o disminución de instancias para manejar la carga de peticiones proporcionalmente a la demanda (tanto aumento de carga como disminución de la misma).

- La cantidad de clientes puede crecer indefinidamente y pero la capacidad computacional queda limitada por los recursos económicos del prestador de servicios.
- Usabilidad: Para esto se realizó el diseño de un user flow en donde se visualiza la relación entre las diferentes pantallas, procesos y funciones a las que tiene acceso el usuario dentro de la app, como lo son:
  - Permisos para acceder a la cámara y a la galería.
  - Tomar una foto.
  - Subir una foto de la galería.
  - Previsualizar la imagen tomada con la cámara o la escogió subir de su galería de fotos.
  - Analizar la imagen.
  - Ver el resultado obtenido.
  - Agregar notas importantes a la imagen analizada.
  - Guardar o descartar el resultado obtenido.
  - Ver el historial de muestras analizadas.
  - Visualizar los resultados guardados en el historial.
  - Abrir la imagen guardada.

- Añadir notas a esta o editarla.
- Opción de analizar una nueva imagen.

Una vez realizado el user flow se procedió a realizar el diseño UX/UI para su posterior desarrollo, esto es importante ya que nos permitió diseñar pantallas que se centran en la sensación general de la experiencia del usuario, teniendo en cuenta los botones, iconos, tipografía, colores.

#### *a) Identificación del color específico del Cryptosporidium spp.*

La imagen obtenida por el dispositivo se encuentra en el espacio de color RGB, un espacio de color limitado. La elección de transformar esta imagen al espacio de color HSV se debe a las ventajas que ofrece para el procesamiento de imágenes.

El espacio HSV proporciona una mejor separación de la información de color al representar el matiz, saturación y valor por separado. Esta separación facilita tareas como la detección de objetos basada en el color y la manipulación de colores específicos.

Además, el componente Value en HSV está directamente relacionado con la luminancia, lo que facilita ajustar la luminosidad de una imagen sin afectar significativamente los colores. En contraste, los cambios en los componentes RGB pueden tener un impacto más complejo en la apa-

riencia del color. La correspondencia del espacio HSV con la percepción humana del color lo hace más intuitivo y útil en aplicaciones donde la interpretación visual es crucial.

En situaciones donde se requiere la segmentación de imágenes o la definición de umbrales para la detección de rangos específicos de colores, el espacio de color HSV ofrece una ventaja adicional.

- **Código para la Conversión de RGB a HSV:**

```
# Convertir los valores RGB a HSV
valores_hsv = cv2.cvtColor(roi, cv2.COLOR_BGR2HSV)
```

La función `cv2.cvtColor` toma la imagen de entrada (`roi` en este caso) y el código de color que especifica la conversión deseada. En este caso, el código `cv2.COLOR_BGR2HSV` indica la conversión de BGR (el formato de color de OpenCV) a HSV.

- **Explicación Matemática:**

Dados los valores RGB:  $R, G, B$

Calcular el máximo y mínimo de  $R, G, B$  :

$$C_{\max} = \max(R, G, B)$$

$$C_{\min} = \min(R, G, B)$$

Calcular el valor (V):  $V = C_{\max}$

Calcular la saturación (S):

$$\text{Si } V \neq 0, \quad S = \frac{C_{\max} - C_{\min}}{C_{\max}}$$

De lo contrario,  $S = 0$

Calcular el matiz (H):

$$\text{Si } C_{\max} = R, \quad H = 60 \left( \frac{G - B}{C_{\max} - C_{\min}} \right) \quad \text{mód } 360$$

$$\text{De lo contrario, si } C_{\max} = G, \quad H = 60 \left( \frac{B - R}{C_{\max} - C_{\min}} + 2 \right) \quad \text{mód } 360$$

$$\text{De lo contrario, si } C_{\max} = B, \quad H = 60 \left( \frac{R - G}{C_{\max} - C_{\min}} + 4 \right) \quad \text{mód } 360$$

(en el código, 'H' es el componente de matiz)

- **Cálculo de Límites para Umbralización en HSV:**

Calcular límites superiores e inferiores para la umbralización de color en HSV

```
color_medio_hsv = np.mean(valores_hsv, axis=0)
```



```
umbral_hsv = 30  
  
limite_inferior_hsv = color_medio_hsv - umbral_hsv  
limite_superior_hsv = color_medio_hsv + umbral_hsv
```

Como resultado de este proceso, podemos observar en la Figura 7.30 un ejemplo de como se utilizaron las imágenes seleccionadas para determinar los valores de Upper y Lower en el espacio de color HSV. Estos valores se obtienen encerrando un área con un cuadrado rojo, cuyas coordenadas corresponden al píxel (1340, 2275).

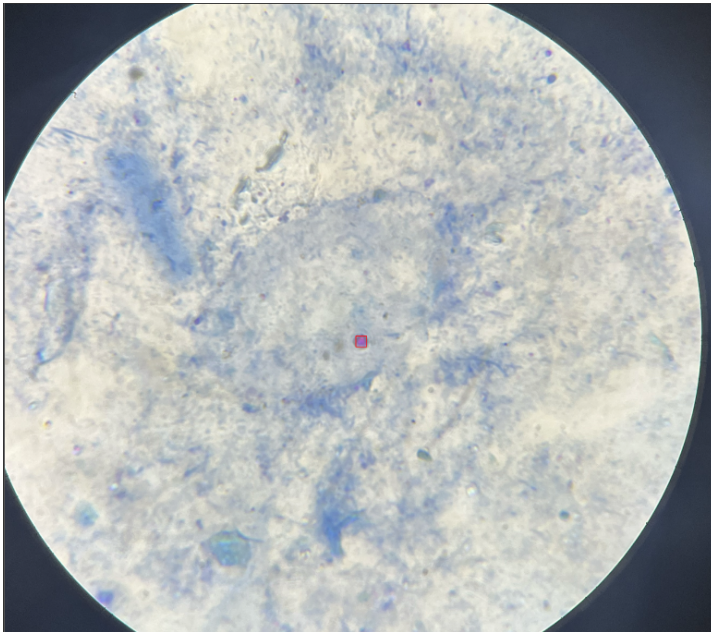


Figura 7.30: Imagen utilizada para encontrar los valores de Upper y Lower en el espacio de color HSV (Elaboración propia).

Además, a continuación, en la Figura 7.31, presentamos los valores obtenidos por el código para calcular el promedio en el espacio de color HSV. Los valores proporcionados por el código son los siguientes: Upper [156.565 122.133 217.032] y Lower [96.275 61.278 156.462].

Valores obtenidos para el Upper			Valores obtenidos para el lower		
Valor en H	Valor en S	Valor en V	Valor en H	Valor en S	Valor en V
152.7	83.4	202.625	92.7	23.4	142.625
152.95	88.925	203.75	92.95	28.925	143.75
152.	92.975	204.15	92.	32.975	144.15
152.1	98.175	206.025	92.1	38.175	146.025
152.275	102.15	208.225	92.275	42.15	148.225
152.275	102.15	208.225	92.8	46.525	151.35
152.8	106.525	211.35	94.3	51.1	153.9
154.3	111.1	213.9	95.6	56.875	156.6
155.6	116.875	216.6	95.725	59.55	157.9
155.725	119.55	217.9	95.925	63.5	159.6
155.925	123.5	219.6	95.975	65.875	161.325
155.975	125.875	221.325	96.15	69.05	163.8
156.15	129.05	223.8	96.55	70.825	165.
156.55	130.825	225.	96.95	73.15	166.6
156.95	133.15	226.6	97.225	72.775	167.475
157.225	132.775	227.475	97.75	74.	168.3
157.75	134.	228.3	98.5	73.225	167.45
158.5	133.225	227.45	98.975	73.85	167.85
158.975	133.85	227.85	99.45	72.875	168.
159.45	132.875	228.	100.05	73.8	168.1
160.05	133.8	228.1	99.975	73.425	167.475
159.975	133.425	227.475	100.1	74.525	167.525
160.1	134.525	227.525	99.7	74.425	166.5
159.7	134.425	226.5	99.425	75.	166.925
159.425	135.	226.925	99.075	73.6	166.75
159.075	133.6	226.75	98.675	74.15	165.775
158.675	134.15	225.775	98.5	72.625	162.85
158.5	132.625	222.85	98.2	71.725	161.475
158.2	131.725	221.475	97.6	68.675	158.475
157.6	128.675	218.475	97.225	66.325	156.075
157.225	126.325	216.075	96.5	61.675	153.8
156.5	121.675	213.8	96.075	58.075	152.25
156.075	118.075	212.25	94.825	52.55	148.925
154.825	112.55	208.925	93.15	47.65	146.7
154.825	112.55	208.925	91.875	42.5	145.025
153.15	107.65	206.7	90.875	38.75	143.575
156.565	122.133	217.032	96.275	61.278	156.462

Figura 7.31: Diagrama de flujo HSV (Elaboración propia).

*b) Identificación de características del Cryptosporidium spp.*

Resultado del algoritmo de identificación:

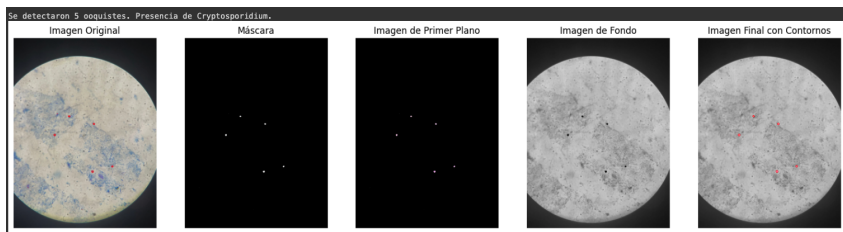
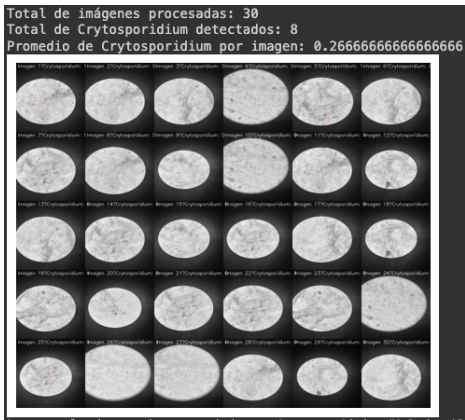


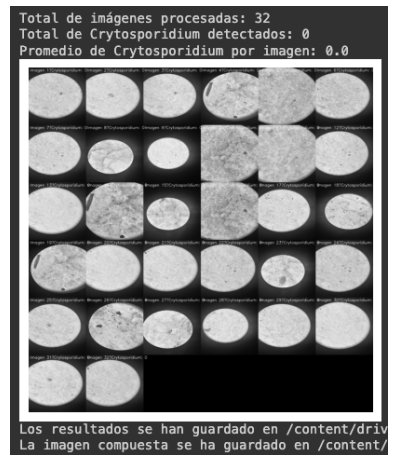
Figura 7.32: Resultado del algoritmo de identificación de características (Elaboración propia).

*c) Evaluación de la extracción de características del Cryptosporidium spp.*

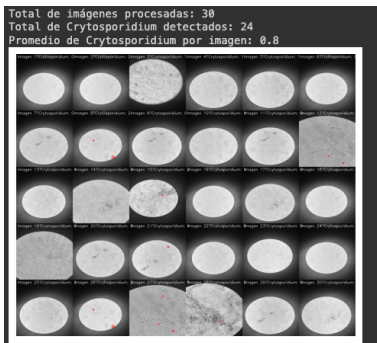
*Resultado del procesamiento del control positivo, negativo y las Laminas de la 1 a la 5*



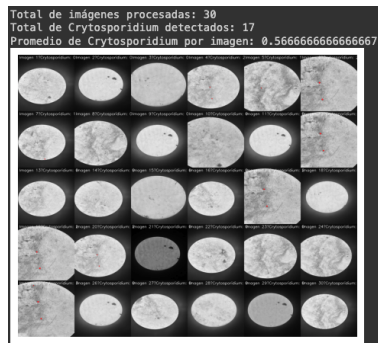
(a) Control positivo



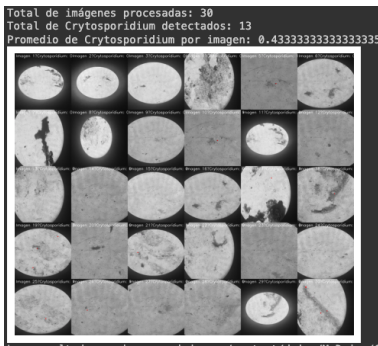
(b) Control negativo



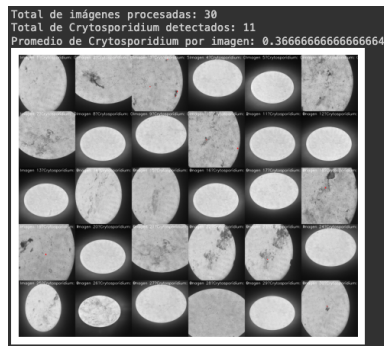
(a) Lamina 1



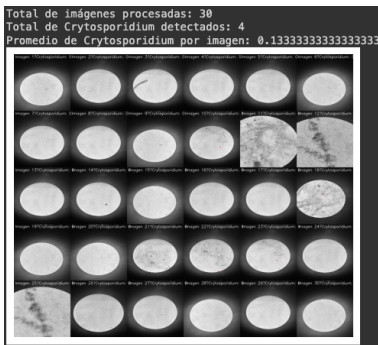
(b) Lamina 2



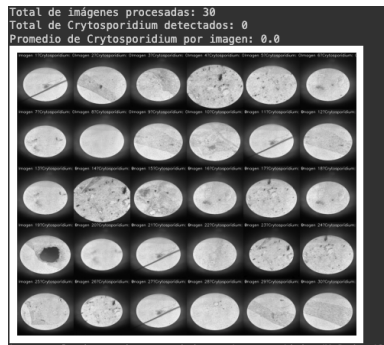
(a) Lamina 3



(b) Lamina 4



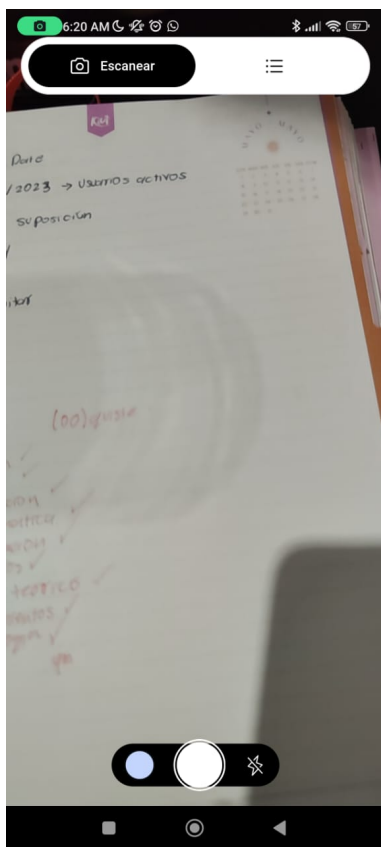
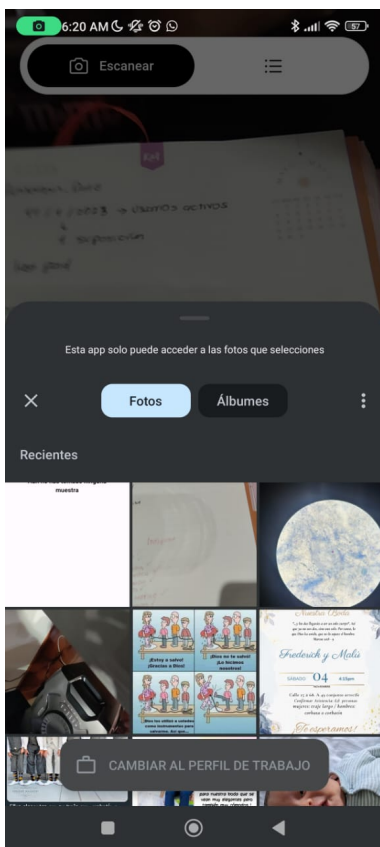
(a) Lamina 5



(b) Lamina 6

Figura 7.33: Resultado final del procesamiento del código

Resultado de la app funcional



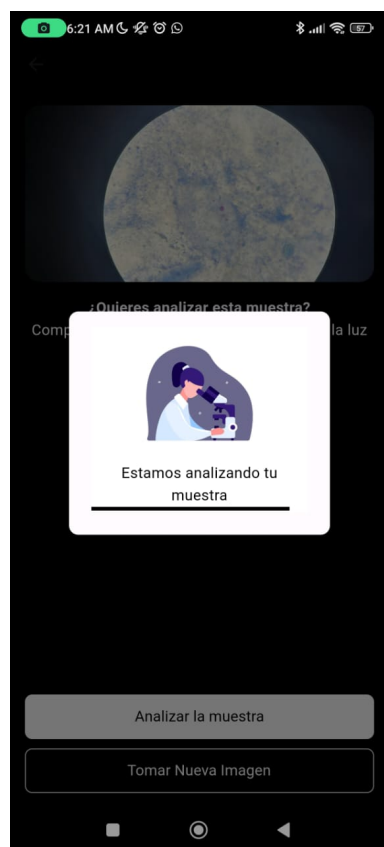
(a) Carga de fotos de la galeria

(b) Toma de fotos con el celular

Figura 7.34: Primera pantalla para tomar o subir una foto de *Cryptosporidium* spp.(Elaboración propia).



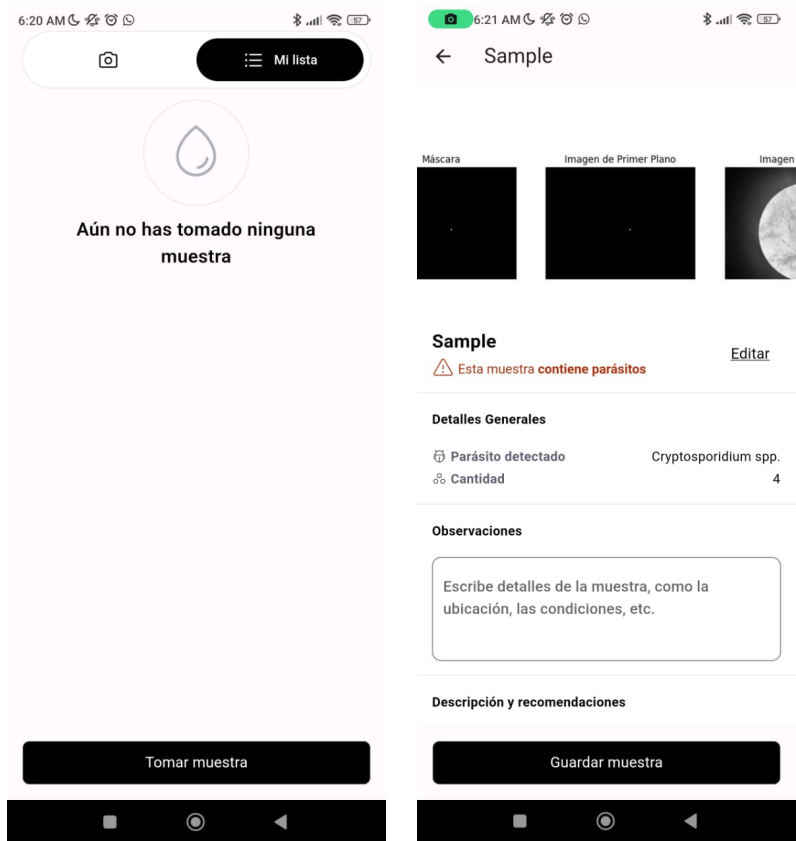
(a) Analizar la muestra o tomar una nueva imagen



(b) Cargando

Figura 7.35: Tercera pantalla de historial y muestra de resultados (Elaboración propia).





(a) Pantalla de historial

(b) Pantalla de resultado

Figura 7.36: Tercera pantalla de historial y muestra de resultados (Elaboración propia).

## Resultado de la fase 4:

Resultados matriz de confusión:

## 1. Control Positivo:

Matriz de Confusión:

```
[[14  1]
 [ 3 12]]
```

Métricas de Evaluación:

Exactitud: 0.87

Precisión: 0.92

Sensibilidad (Recall): 0.80

Puntuación F1: 0.86

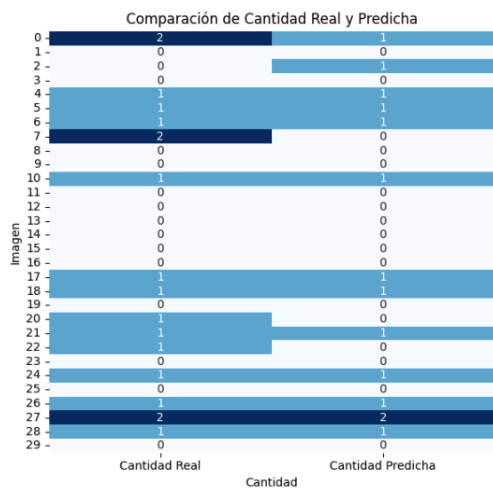
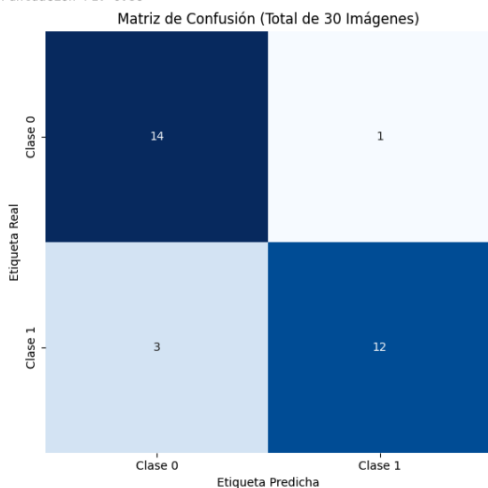


Figura 7.37: Resultados matriz de confusión control positivo y mapas de calor

El modelo en el **control positivo** tiene una precisión del 92 %, lo que significa que la mayoría de las instancias clasificadas como positivas realmente son positivas. Sin embargo, la sensibilidad es del 80 %, indicando que no identifica todas las instancias positivas. La exactitud general es del 87 %, y la puntuación F1 es del 86 %.

## 2. Control Negativo:

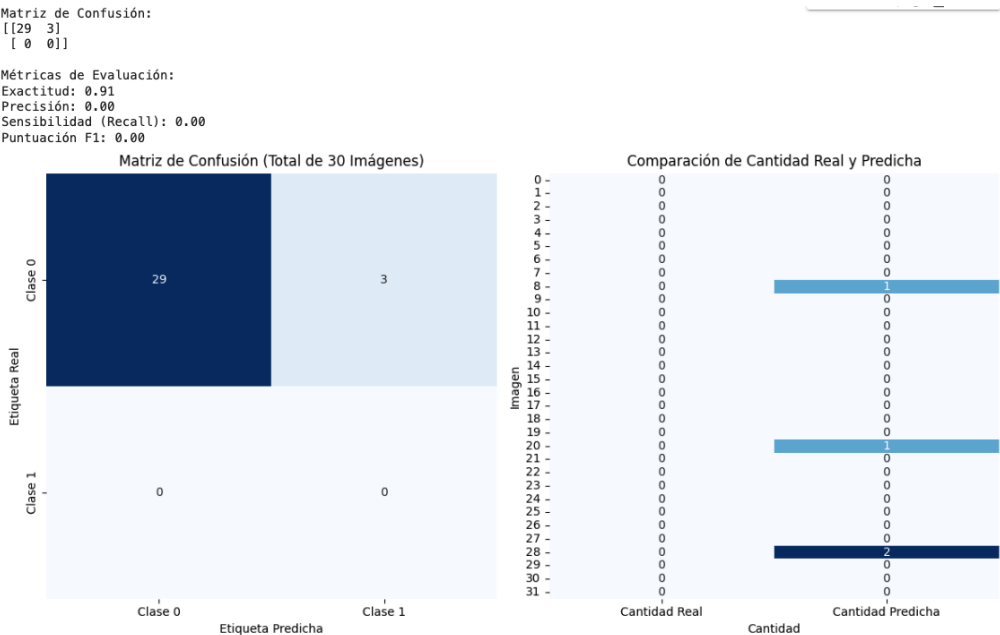


Figura 7.38: Resultados matriz de confusión control negativo y mapas de calor

En el **control negativo**, la precisión es baja (0 %), indicando que todas las instancias clasificadas como positivas son falsos positivos. La sensibilidad y la puntuación F1 son ambas 0, lo que sugiere que el modelo no identifica correctamente ninguna instancia positiva.

3. **Lamina 1:**

Matriz de Confusión:  
[[15 2]  
[ 2 11]]

Métricas de Evaluación:  
Exactitud: 0.87  
Precisión: 0.85  
Sensibilidad (Recall): 0.85  
Puntuación F1: 0.85

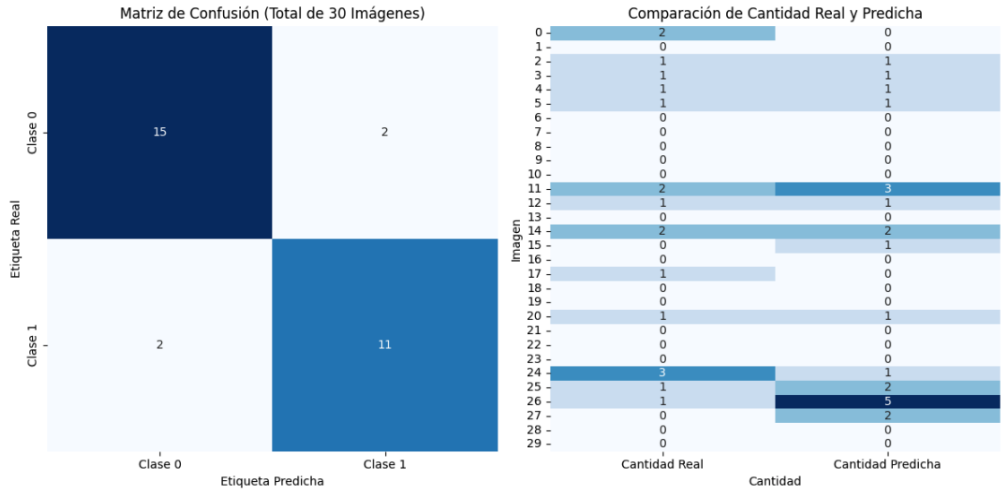


Figura 7.39: Resultados matriz de confusión lamina 1 y mapas de calor

En la **lamina 1**, el modelo tiene un buen equilibrio entre precisión y sensibilidad, con ambas métricas igual a 85 %. La exactitud general es del 87 %, y la puntuación F1 es del 85 %.

4. **Lamina 2:**

Matriz de Confusión:  
[[16 1]  
[ 3 10]]

Métricas de Evaluación:  
Exactitud: 0.87  
Precisión: 0.91  
Sensibilidad (Recall): 0.77  
Puntuación F1: 0.83

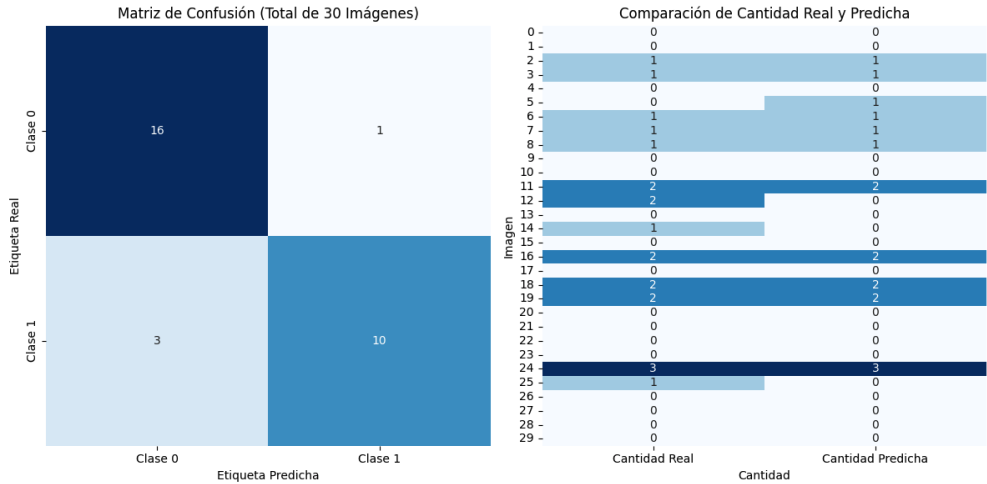


Figura 7.40: Resultados matriz de confusión lamina 2 y mapas de calor

En la **lámina 2**, el modelo tiene una precisión más alta (91 %) pero una sensibilidad más baja (77 %). La exactitud general es del 87 %, y la puntuación F1 es del 83 %.

5. **Lamina 3:**

Matriz de Confusión:  
[[21 0]  
[ 1 8]]

Métricas de Evaluación:  
Exactitud: 0.97  
Precisión: 1.00  
Sensibilidad (Recall): 0.89  
Puntuación F1: 0.94

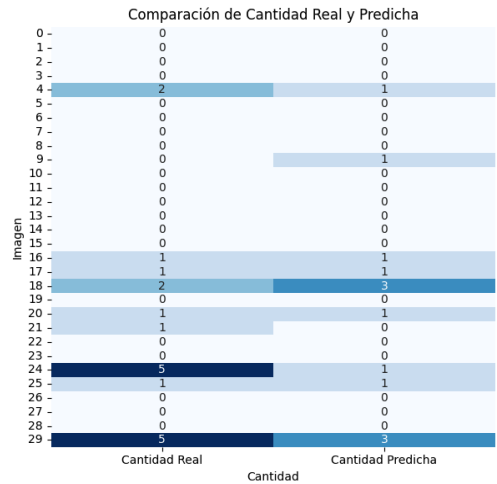
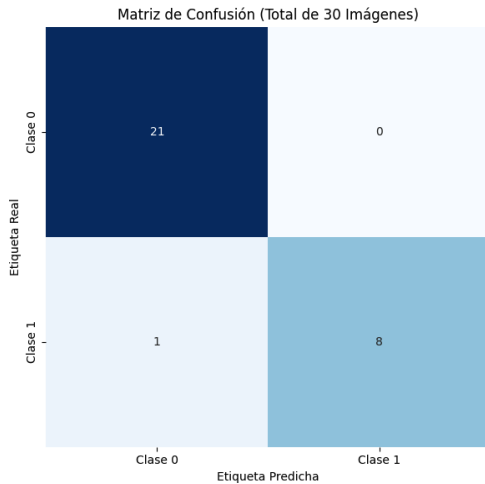


Figura 7.41: Resultados matriz de confusión lamina 3 y mapas de calor

En la **lámina 3**, el modelo muestra un rendimiento excepcional con precisión, sensibilidad y puntuación F1 todos igual a 1.00. La exactitud general es del 97 %.

## 6. Lamina 4:

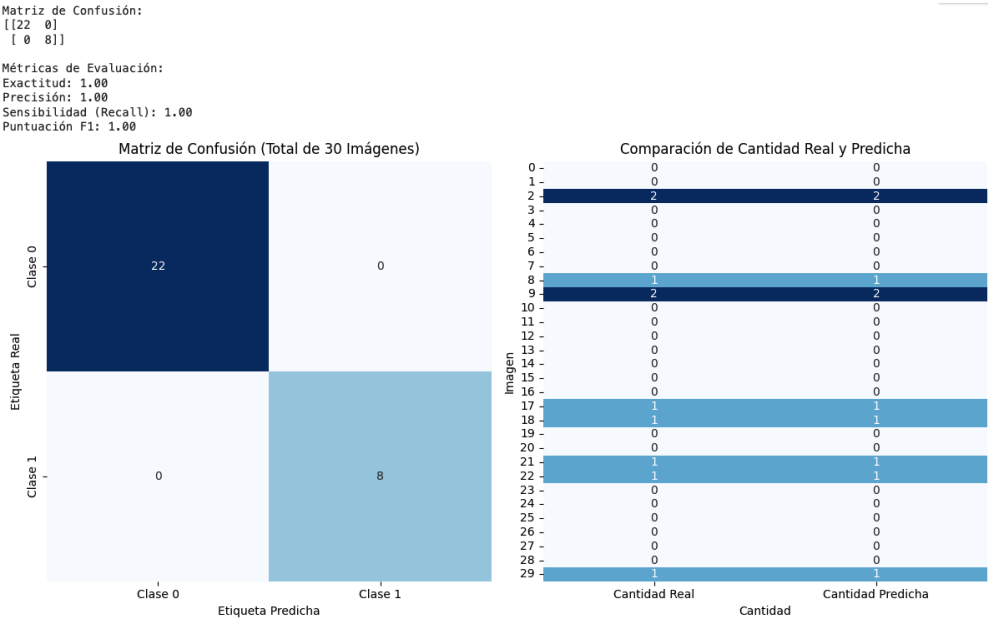


Figura 7.42: Resultados matriz de confusión lamina 4 y mapas de calor

En la **lámina 4**, el modelo tiene un rendimiento perfecto con todas las métricas igual a 1.00. La exactitud general es del 100 %.

7. **Lamina 5:**

Matriz de Confusión:  
[[25 0]  
[ 1 4]]

Métricas de Evaluación:  
Exactitud: 0.97  
Precisión: 1.00  
Sensibilidad (Recall): 0.80  
Puntuación F1: 0.89

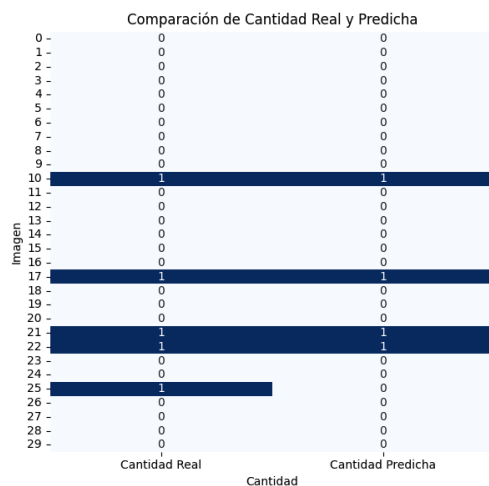
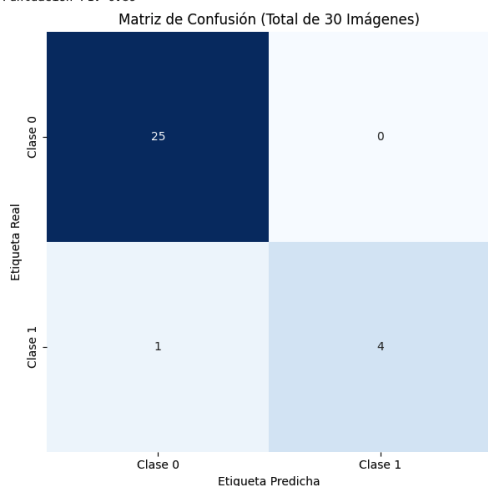


Figura 7.43: Resultados matriz de confusión lamina 5 y mapas de calor

En la **lámina 5**, el modelo muestra un rendimiento sólido, con una precisión perfecta y una sensibilidad del 80 %. La exactitud general es del 97 %.

## 8. Lamina 6:



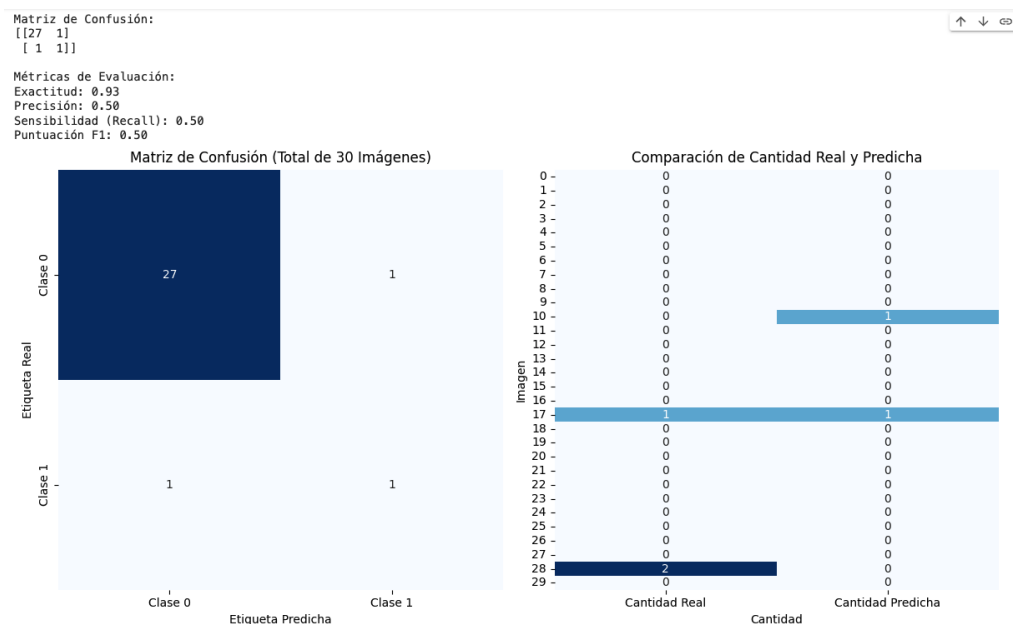


Figura 7.44: Resultados matriz de confusión lamina 6 y mapas de calor

En la **lámina 6**, el modelo muestra una precisión del 50 %, indicando que la mitad de las instancias clasificadas como positivas son verdaderas positivas. La sensibilidad también es del 50 %, y la exactitud general es del 93 %. La puntuación F1 es del 50 %, indicando un rendimiento balanceado entre precisión y sensibilidad.

El presente estudio se enfoca en la evaluación del rendimiento de un modelo de clasificación en el análisis de 270 imágenes del microorganismo *Cryptosporidium* spp. Las métricas de evaluación, tales como la exactitud, precisión, sensibilidad (recall) y puntuación F1, se han calcu-

lado para cada una de estas pruebas, proporcionando una visión detallada del desempeño del modelo en las diferentes laminas examinadas. A continuación, se presentan los promedios de estas métricas, así como una conclusión general que destaca los puntos fuertes y posibles áreas de mejora del modelo en su capacidad predictiva.

Promedio de Exactitud:

$$\frac{0,87 + 0,91 + 0,87 + 0,87 + 0,97 + 1,00 + 0,97 + 0,93}{8} = 0,9225$$

Promedio de Precisión:

$$\frac{0,92 + 0,00 + 0,85 + 0,91 + 1,00 + 1,00 + 1,00 + 0,50}{8} = 0,8100$$

Promedio de Sensibilidad (Recall):

$$\frac{0,80 + 0,00 + 0,85 + 0,77 + 0,89 + 1,00 + 0,80 + 0,50}{8} = 0,7625$$

Promedio de Puntuación F1:

$$\frac{0,86 + 0,00 + 0,85 + 0,83 + 0,94 + 1,00 + 0,89 + 0,50}{8} = 0,8125$$

- **Control positivo:** El modelo tiene un buen desempeño en precisión y puntuación F1, pero la sensibilidad es un poco baja, indicando posibles casos no detectados.

- **Control negativo:** Aunque la exactitud es alta, la precisión, sensibilidad y puntuación F1 son bajas, sugiriendo problemas en la identificación de casos negativos.
- **Laminas 1, 2, 3, 4, 5, y 6:** En general, el modelo mostró una correcta caracterización del *Cryptosporidium* spp. teniendo para la lamina 6 una excepción en la detección de casos positivos debido a la baja concentración de (oo)quistes dada en la dilución de  $10^{-5}$ . Demostrando de esta manera una puntuación F1 de 0.50 mas baja del modelo.

Resultado de los servicios contratados para análisis de agua filtrada por el laboratorio de salud pública departamental del meta:

MUESTRA	LAMINA	IDENTIFICACIÓN		(OO)QUISTES TOTALES EN 30 CAMPOS DE OBSERVACIÓN	CANTIDAD PROMEDIO ENCONTRADA POR LAMINA / 30 CAMPOS DE OBSERVACIÓN
		SI	NO		
M1-10	M1-1.1		X	0	0
	M1-1.2		X	0	0
M2-10 <sup>-1</sup>	M2-2.1	X		18	0.60
	M2-2.2	X		11	0.36
M3-10 <sup>-3</sup>	M3-3.1	X		8	0.26
	M3-3.2	X		6	0.2
M4-10 <sup>-5</sup>	M3-3.1	X		2	0.06
	M3-3.2		X	0	0

Figura 7.45: Tabla de resultados laboratorio clinico

Para los siguientes cálculos se tiene como valor de referencia 0.26 (oo)quistes/Campo calculado gracias al control positivo suministrado por

la Pontificia Universidad Javeriana, estableciendo una concentración de 8 (oo)quistes/mL.

Al tener el resultado por parte del laboratorio contratado, se procede a calcular por medio de la siguiente ecuación la desviación estándar muestral y exactitud, siendo estos los resultados:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0-0.26)^2+(0-0.26)^2+(0.60-0.26)^2+(0.36-0.26)^2+(0.26-0.26)^2+(0.2-0.26)^2+(0.06-0.26)^2+(0-0.26)^2}{7}} = 0,216$$

Figura 7.46: Desviación estándar muestral Laboratorio clínico

$$Er = \frac{0,185-0,26}{0,26} \times 100 = - 28,84$$

Figura 7.47: Exactitud arrojada por el laboratorio

MUESTRA	TOTAL DETECTADOS	TOTAL DETECTADOS/30 CAMPOS
Control Negativo	0	0
Control Negativo	0	0
Lámina 1	24	0.8
Lámina 2	17	0.56
Lámina 3	13	0.43
Lámina 4	11	0.36
Lámina 5	4	0.13
Lámina 6	0	0

Figura 7.48: Promedio de (oo)quistes encontrados por muestra procesada con el dispositivo.

Al tener el resultado por parte del dispositivo y el software, se procede a calcular por medio de las ecuaciones de desviación estándar muestral y exactitud, siendo estos los resultados:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0-0.26)^2 + (0-0.26)^2 + (0.80-0.26)^2 + (0.56-0.26)^2 + (0.43-0.26)^2 + (0.36-0.26)^2 + (0.13-0.26)^2 + (0-0.26)^2}{7}} = 0,301$$

Figura 7.49: Desviación estándar muestral dispositivo

$$Er = \frac{0,185-0,26}{0,26} \times 100 = 7,69$$

Figura 7.50: Exactitud calculada para los datos arrojados por el dispositivo

Por medio de los resultados obtenidos entre ambas comparaciones, se puede establecer una relación de detección entre ambos métodos, estando a 0.085 unidades de diferencia, siendo métodos precisos según su desviación estándar muestral, estableciendo que el resultado arrojado por el dispositivo de bajo costo alcance los estándares de evaluación y cuantificación de muestras de agua contaminadas por *Cryptosporidium* spp. que se dan en un laboratorio clínico avalado por la resolución 2115 del 2009 y la 1615 del 2015, siendo una herramienta viable y eficiente para poder generar diagnósticos sobre la presencia de *Cryptosporidium* Spp. en muestras de agua filtrada por métodos granulares.

Gracias a la exactitud calculada, es posible afirmar que el método con

menor dispersión y más acorde a la concentración teórica conocida es la dada por el dispositivo, estando a 9,61 unidades de ser completamente exacto, brindando una herramienta con un buen índice de repetibilidad en sus resultados. El algoritmo arrojó una concentración promedio de 0,285, siendo muy cercana a la real, estableciendo que la extracción de características es un método confiable para la detección de microorganismos en aguas con una turbidez no mayor a 5 NTU con valores de pH en una escala neutra y con valores de conductividad no mayores a 490  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

# Conclusiones

La construcción del dispositivo se basó en un proceso de toma de decisiones que evaluó diversas características, como el material de construcción y los sistemas de enfoque, iluminación y mecánico. A lo largo del proyecto, se ajustaron estos aspectos según los requerimientos definidos y los resultados obtenidos de un proceso de iteración. El resultado fue un dispositivo portable con una capacidad resolutive, de 1000X aumentos, una apertura de 1,25mm generando campos de observación de 8 mm, cumpliendo con los estándares de la norma ISO 8255-1:2017, logrando la observación de microorganismos con un tamaño de 2 - 8  $\mu\text{m}$ , dándole al usuario un manejo manual del sistema de enfoque, movimiento de las muestras y exposición de luz. El dispositivo final tuvo dimensiones de 43 cm de alto, 40 cm de largo y 23 cm de ancho, con un peso de 6 kg y una autonomía de batería de 1,40 horas con ciclos de car-

ga completos. Esto lo convierte en un dispositivo portable de bajo costo capaz de contribuir a la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua.

El diseño y construcción del dispositivo le brinda características únicas para completar la tarea de identificación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp. por medio de técnicas de microscopia, apoyadas en visión artificial con el fin de detectar en muestras de agua la cantidad de (oo)quistes encontrados por mililitro de muestra procesada, superando los dispositivos encontrados comercialmente tanto en costos como en funcionalidad, dándole al usuario una herramienta con una resolución de movimiento de 0.01 mm para el sistema de enfoque, de fácil uso acompañada de una aplicación móvil para su guía de funcionamiento y trazabilidad, siendo el costo total de \$1.661.072 COP.

En la construcción del conjunto de datos, se categorizaron los resultados en función de diferentes configuraciones de obturación y posiciones del sistema de enfoque e iluminación. Esto permitió la recopilación de un conjunto de datos compuesto por 270 imágenes. Estas imágenes destacan las características distintivas de las muestras positivas y negativas, lo que facilita el análisis de las características morfológicas y morfológicas de los microorganismos.

En el proceso de validación de los resultados obtenidos se construyó una matriz de confusión arrojando un resultado promedio de presión



81 %, exactitud 92 %, sensibilidad (Recall) 76 % y puntuación F1 de 81 %, dándonos un modelo confiable para la detección del microorganismo en muestras de agua.

El modelo de identificación de características produjo una concentración promedio de 0.285, que se acercó considerablemente a los valores reales. Esto demuestra que la extracción de características es un método confiable para la detección de microorganismos en aguas con una turbidez no superior a 5 NTU, en un rango de pH neutro y con valores de conductividad no superiores a 490  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

# Recomendaciones

Recomendación 1: En aras de mejorar la utilidad de esta herramienta, se sugiere considerar la extracción de características y la implementación de métodos de entrenamiento que permitan la identificación y cuantificación de diversos tipos de microorganismos. Esto ampliará su aplicación en investigaciones futuras y la convertirá en una herramienta versátil para el análisis de muestras de agua.

Recomendación 2: Como extensión a este trabajo, sería beneficioso desarrollar un modelo de entrenamiento que no se limite exclusivamente a la identificación de *Cryptosporidium*, sino que tenga la capacidad de reconocer otros microorganismos presentes en las muestras de agua. Esto contribuirá a una detección más integral y versátil de posibles patógenos y microorganismos de interés en el monitoreo de la calidad del agua.

Recomendación 3: En caso de que la aplicación se desarrolle para su publicación y comience a atraer una base de usuarios activa, se sugiere la incorporación de un sistema de inicio de sesión de usuario. Esto permitirá la identificación de los usuarios y facilitará el almacenamiento de las muestras de manera personalizada para cada usuario. Esto mejorará la experiencia del usuario y garantizará un acceso seguro a sus datos.

Recomendación 4: Para optimizar la infraestructura de la aplicación a medida que crece su uso, se podría considerar la implementación de un servidor más robusto. Un servidor escalable y resistente ayudará a mantener un rendimiento constante y confiable, especialmente cuando la cantidad de usuarios y datos aumenta. Esto garantizará una experiencia sin interrupciones para los usuarios y la capacidad de gestionar eficazmente un mayor volumen de datos.

# Referencias

Adams et ál. (1994). *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *J Infect Dis*, 169(1), 170-7. Published by Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Arauca

Aliexpress, A. (2021). Microscopio de video digital para circuitos. Aliexpress. Retrieved from <https://es.aliexpress.com/item/4001260076533.html>

Arnedo, I. (s. f.). Técnicas para la detección de *cryptosporidium* SP. en sistemas de tratamiento de agua residual. <https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0075-522220080002000>

Arboleda, J. (2021). Centro de Microscopía Avanzada. Udea.edu.co.

Retrieved 27 de abril de 2021, from <http://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/investigacion/laboratorios-infraestructura/centro-microscopia-avanzada/contenido/asmenulateral.html>

Arnedo, I., Bracho, M., Díaz-Suárez, O., & Botero, L. (2008). Técnicas para la detección de *Cryptosporidium sp.* en sistemas de tratamiento de agua residual. *Ve.scielo.org*. Retrieved 3 de junio de 2021, from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid) .

Amazon.com: LCD Digital Microscope, SKYBASIC 4.3 inch 50X-1000X Magnification Zoom HD 2 Megapixels Compound 2600 mAh Battery USB Microscope 8 Adjustable LED Light Video Camera Microscope with 32G TF Card: Electronics. (n.d.). [https://www.amazon.com/Microscopio-50X-1000X-Ampliaci%C3%B3n-megap%C3%ADx-les-Ajustables/dp/B07PDQSKM4/ref=asc\\_df\\_B07PDQSKM4/?tag=cogoshpadde-20&linkCode=df0&hvadid=675396283856&hvpos=&hvnetw=g&hvrnd=6836922720953400759&hvpone=&hvptwo=&hvqmt=&hvdev=c&hvdvcmdl=&hvlocint=&hvlocphy=1003662&hvtarqpla-692616668100&psc=1&language=es-US&mcid=8a61a18bf5483102](https://www.amazon.com/Microscopio-50X-1000X-Ampliaci%C3%B3n-megap%C3%ADx-les-Ajustables/dp/B07PDQSKM4/ref=asc_df_B07PDQSKM4/?tag=cogoshpadde-20&linkCode=df0&hvadid=675396283856&hvpos=&hvnetw=g&hvrnd=6836922720953400759&hvpone=&hvptwo=&hvqmt=&hvdev=c&hvdvcmdl=&hvlocint=&hvlocphy=1003662&hvtarqpla-692616668100&psc=1&language=es-US&mcid=8a61a18bf5483102)

Amazon.com: [Research-Grade] Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes 40X-2000X Magnification with 7"LCD Screen 5MP Eyepiece, Two-Layer Mechanical Stage for Animal Husbandry, Pet Hos-

pitals, Lab, Farms: Industrial Scientific. (n.d.). [https://www.amazon.com/dp/B09P8YKH76/ref=sspa\\_dk\\_detail\\_1?pd\\_rd\\_i=B09P8YKH76&pd\\_rd\\_w=z1C5w&content-id=amzn1.sym.0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\\_rd\\_p=0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\\_rd\\_r=7VXSFXRN6SVY1SY69WNW&pd\\_rd\\_wg=1jbgS&pd\\_rd\\_r=bea02b9b-0536-4e01-979a-de0c5e7d6d4a&s=photo&sp\\_csd=d2lkZ2V0TmFtZT1zcF9kZXRhYWwy&th=1](https://www.amazon.com/dp/B09P8YKH76/ref=sspa_dk_detail_1?pd_rd_i=B09P8YKH76&pd_rd_w=z1C5w&content-id=amzn1.sym.0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf_rd_p=0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf_rd_r=7VXSFXRN6SVY1SY69WNW&pd_rd_wg=1jbgS&pd_rd_r=bea02b9b-0536-4e01-979a-de0c5e7d6d4a&s=photo&sp_csd=d2lkZ2V0TmFtZT1zcF9kZXRhYWwy&th=1)

Amazon.com: AMScope M158C-E Compound Monocular Microscope, WF10x and WF25x eyepieces, 40x-1000x magnification, Bright-field, LED illumination, Plain stage, 110V, includes 0.3MP camera and software: Electronics. (n.d.). [https://www.amazon.com/AmScope-Microscope-Magnification-Brightfield-Illumination/dp/B006FCI0G8/ref=pd\\_ci\\_mcx\\_di\\_int\\_sccai\\_cn\\_scc1\\_2\\_1/137-2359779-8822936?pd\\_rd\\_w=PARb4&content-id=amzn1.sym.751acc83-5c05-42d0-a15e-303622651e1e&pf\\_rd\\_p=751acc83-5c05-42d0-a15e-303622651e1e&pf\\_rd\\_r=1PNXWVK15468QD&pd\\_rd\\_wg=VBJD4&pd\\_rd\\_r=c3785d33-f274-4aa7-9115-a7dcdae81f74&pd\\_rd\\_i=B006FCI0G8&psc=1](https://www.amazon.com/AmScope-Microscope-Magnification-Brightfield-Illumination/dp/B006FCI0G8/ref=pd_ci_mcx_di_int_sccai_cn_scc1_2_1/137-2359779-8822936?pd_rd_w=PARb4&content-id=amzn1.sym.751acc83-5c05-42d0-a15e-303622651e1e&pf_rd_p=751acc83-5c05-42d0-a15e-303622651e1e&pf_rd_r=1PNXWVK15468QD&pd_rd_wg=VBJD4&pd_rd_r=c3785d33-f274-4aa7-9115-a7dcdae81f74&pd_rd_i=B006FCI0G8&psc=1)

Amazon.com: [Research-Grade] Vabiooth Lab Compound Trinocular Microscopes 40X-2000X Magnification with 7"LCD Screen 5MP Eyepiece, Two-Layer Mechanical Stage for Animal Husbandry, Pet Hospitals, Lab, Farms: Industrial Scientific. (n.d.). [https://www.amazon.com/dp/B09P8YKH76/ref=sspa\\_dk\\_detail\\_1?pd\\_rd\\_i=B09P8YKH76&pd\\_rd\\_w=z1C5w&content-id=amzn1.sym.0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\\_rd\\_p=0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\\_rd\\_r=7VXSFXRN6SVY1SY69WNW&pd\\_rd\\_wg=1jbgS&pd\\_rd\\_r=bea02b9b-0536-4e01-979a-de0c5e7d6d4a&s=photo&sp\\_csd=d2lkZ2V0TmFtZT1zcF9kZXRhYWwy&th=1](https://www.amazon.com/dp/B09P8YKH76/ref=sspa_dk_detail_1?pd_rd_i=B09P8YKH76&pd_rd_w=z1C5w&content-id=amzn1.sym.0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf_rd_p=0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf_rd_r=7VXSFXRN6SVY1SY69WNW&pd_rd_wg=1jbgS&pd_rd_r=bea02b9b-0536-4e01-979a-de0c5e7d6d4a&s=photo&sp_csd=d2lkZ2V0TmFtZT1zcF9kZXRhYWwy&th=1)

\_rd\_w=z1C5w&content-id=amzn1.sym.0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\_rd\_p=0d1092dc-81bb-493f-8769-d5c802257e94&pf\_rd\_r=7VXSFXRN6SVY1SY69WNW&pd\_rd\_wg=1jbgS&pd\_rd\_r=bea02b9b-0536-4e01-979a-de0c5e7d6d4a&s=photo&sp\_csd=d2lkZ2V0TmFtZT1zcF9kZXRhaWwy&th=1

AVANTOR, A. (2021). *Conectar — VWR. Es.vwr.com*. Retrieved 4 de junio de 2021, from [https://es.vwr.com/store/account/welcomePage.jsp?\\_requestid=1351222](https://es.vwr.com/store/account/welcomePage.jsp?_requestid=1351222).

Bayona, M., Avendaño, C., & Amaya, Á. (2011). Caracterización epidemiológica de la criptosporidiosis en población infantil de la región Sabana centro (Cundinamarca). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 7-13.

Bermúdez, M., Rojas, A. F. P., & David, C. (2015). Diseño e implementación de un sistema de detección de malezas en cultivos cundiboyacenses. Retrieved from <https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/3202/4/DISE%C3%91O%20E%20IMPLEMENTACI%C3%93N%20DE%20UN%20SISTEMA%20DE%20DETECCI%C3%93N%20DE%20MALEZAS%20EN%20CULTIVOS%20CUNDIBOYACENSES.pdf>

Bloomberg, C. B. (2022, 14 febrero). MORTALIDAD EN COLOMBIA 2020-2021. Minsalud. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/colombia-periodo-2020-2021.pdf>

BETANCOURT, D. (2013). Sistema de visión por computador para detectar hierba no deseada en prototipo de cultivo de frijol usando ambiente controlado. 64p. Trabajo de grado (Ingeniero). Retrieved 6 de mayo de 2021, from Universidad Católica de Colombia. Facultad de Ingeniería. Electrónica y Telecomunicaciones. Visión Artificial.

Boronat Gil, R., & López Pérez, J. (2018). Una visión cercana de la Microscopía en el Laboratorio de Educación Secundaria. Retrieved 27 de abril de 2021, from [http://www.carm.es/edu/pub/19800\\_2020/pub\\_contenido\\_09\\_seleccion-de-imagenes.html](http://www.carm.es/edu/pub/19800_2020/pub_contenido_09_seleccion-de-imagenes.html)

Boué, E. (2010). REDALYC. Redalyc.org. Retrieved 19 March 2021, from <https://www.redalyc.org/pdf/5517/551757306007.pdf>.

Boufassa-Ouzrout, S., Chermette, R. y Meissonnier, E. (1986). La Cryptosporidiose. Une maladie animale et humaine cosmopolite. Office International de épizooties, Série Technique N° 5: 97 págs. 3.

Bradford, L.E., Bharadwaj, L.A., Okpalauwaekwe, U. y Waldner, C.L. Drinking Water Quality in Indigenous Communities in Canada and Health Outcomes: a Scoping Review, doi: 10.3402/ijch.v75.32336, International Journal of Circumpolar Health, 75(1), 32336 (2016)

Briceño, Katherine, (2018). Tinción de Ziehl-Neelsen. Lifeder. Re-



cuperado de <https://www.lifeder.com/tincion-ziehl-neelsen>

Brondson, M.A. (1984). Rapid dimethyl Sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 925-953

Cañavate, C. (2009). Seimc.org. Retrieved 8 May 2021, from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimiento-seimc-procedimientomicrobiologia35.pdf>.

Carlos, M. G. (n.d.). El complejo articular de la muñeca: aspectos anatófisiológicos y biomecánicos, características, clasificación y tratamiento de la fractura distal del radio. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2016000400011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2016000400011)

Castillo, E. P. (2021, 6 abril). Plan Institucional de Capacitación - PIC – 2021 - GOBERNACIÓN DE LA GUAJIRA. <https://www.version3.laguajira.gov.co/la-gobernacion/gobierno-transparente/205-plan-es-institucionales/6780-plan-institucional-de-capacitacion-pic-2021.html>

Córdoba, C. (2018). Boletín Macrosectorial. Contraloria.gov.co. Retrieved 5 May 2021, from <https://www.contraloria.gov.co/>

documents/463406/1185469/Bolet%C3%ADn+Macrosectorial+No.+018.pdf/fdd07c00-6270-4df1-aaf0-dcf87661f1f2?version=1.0.

CORPOGUAJIRA, C. (2006). CORPOGUAJIRA. Corpoguajira.gov.co. Retrieved 7 April 2021, from [http://corpoguajira.gov.co/web/attachments\\_Joom/article/483/PMA%20MAICAO.pdf](http://corpoguajira.gov.co/web/attachments_Joom/article/483/PMA%20MAICAO.pdf).

Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22(6):471–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.101>

DANE resultados del censo nacional de población y vivienda 2019. Retrieved 10 May 2021, from <https://www.dane.gov.co/files/censo2018/informaciontecnica/presentacionesterritorio/190816-CNPV-presentacion-La-Guajira-Riohacha.pdf>

Davidson, M. (2018). Molecular Expressions Microscopy Primer: Anatomy of the Microscope - Introduction. Micro.magnet.fsu.edu. Retrieved 27 April 2021, from <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html>.

Daza, A., & Serna, C. (2018). El Recurso Agua en las Comunidades Indígenas Wayuu de La Guajira Colombiana. Parte 2: Estudio Cualitativo de las Condiciones de Higiene, Aseo y Disponibilidad de Agua. Scie-

lo.org. Retrieved 12 May 2021, from [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-076420180006000es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-076420180006000es&nrm=iso).

Daza, A., & Serna, C. (2018). El Recurso Agua en las Comunidades Indígenas Wayuu de La Guajira Colombiana. Scielo. Retrieved 7 April 2021, from [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642018000600025](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642018000600025).

Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., & Basualdo, J. A. (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista argentina de microbiología*, 41(3), 185-196.

Detección de coccidios en niños asintomáticos mediante esporulación de muestras fecales. Scielo.org.pe. Retrieved 13 May 2021, from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832004000400004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832004000400004).

Durango, R., Belandria, K., Quintero, M., García, G., & López, K. (2011). Infestación por *Cryptosporidium* Spp e *Isospora* Belli en preescolar inmunocompetente: A propósito de un caso. *Gen*, 65(3), 230-233.

Díez, G. D. (2020, 16 marzo). Estudio y diseño de un microscopio low-cost para la detección a bajo coste de infecciones en las muestras de sangre. <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/>

180105?show=full

Diego Gonzales, (2019, October 30). PDF. <https://es.slideshare.net/diegoalexandergonzal3/tabla-deresistenciadepernos>

Escalera, A. (2017). Ocw.uc3m.es. Retrieved 13 May 2021, from <http://ocw.uc3m.es/ingenieriade-sistemas-y-automatica/sistemas-percepcion/material-declase-1/mc-f-05.pdf>.  
.

EPA (2015 -07 ) Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/epa-1623.pdf>

Farga, A. (2018). SEIMC. Seimc.org. Retrieved 27 April 2021, from <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/isoporabelli.pdf>.

Fernando, P. S. (2004, 1 mayo). Infecciones gastrointestinales. Offarm. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-infecciones-gastrointestinales>  
13061801

García Dávila, Paola, & Rivera Fernández, Norma. (2017). El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica. Revista de la Facultad de Medicina (México), 60(6), 40-46. Recuperado en 09 de

mayo de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S002617422017000600040&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002617422017000600040&lng=es&tlng=es)

Garcia, I. (2008). Manual de laboratorio de Parasitología. Revistareduca.es. Retrieved 30 May 2021, from <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/778/794>.

GEGMIC, G. (2004). Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-00. Seimc.org. Retrieved 30 May 2021, from [https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gegmic/dcientificos/documentos/gegmic\\_dyc1\\_2004.pdf](https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gegmic/dcientificos/documentos/gegmic_dyc1_2004.pdf).

Grajeda, F. (2018). Eprints.uanl.mx. Retrieved 6 May 2021, from <http://eprints.uanl.mx/16664/1/1080290301.pdf>.

Granados, A. (1998). Resumen del estudio hidrogeológico de la media y baja Guajira. Revistas.sgc.gov.co. from <https://revistas.sgc.gov.co/index.php/boletingeo/article/view/212>.

GrupLac, G. (2014). Portal Minciencias. Sba.minciencias.gov.co. Retrieved 3 June 2021, from <https://sba.minciencias.gov.co/buscador/?q=+cryptosporidium&pagenum=1&start=0&type=>

load&op=

HACH, H. (2021). Filtros y accesorios para microbiología — Hach España - Aspectos Generales — Hach. Es.hach.com. Retrieved 4 June 2021, from <https://es.hach.com/material-de-laboratorio/filtros-y-accesorios-para-microbiologia/family?productCategory=36030119170>.

Hernández-Gallo, N., Hernández-Flórez, L. J., & Cortés-Vecino, J. A. (2018). Criptosporidiosis y «Una Salud». *Revista de Salud Pública*, 20, 138-143.

Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*. 2005;35(11–12):1181–90.

Huiza, A., Espinoza, Y., Rojas, R., Sevilla, C., Alva, P., & Verástegui, R. et al. (2004).

IDEAM, I. (2012). Demanda agua - IDEAM. Siac.gov.co. Retrieved 6 April 2021, from <http://www.siac.gov.co/demandaagua#:~:text=El%20mayor%20consumo%20de%20agua,con%20el%2017%2C9%25>.

IDEAM, I. (2018). IDEAM SGC. Ideam.gov.co. Retrieved 6 April 2021, from <http://www.ideam.gov.co/documents/24277/>

0/Cartilla+ENA+pags.pdf/41815df7-5a90-4d9e-bcb4-a590c270208

.

INS, I. (2015). Ins.gov.co. Retrieved 5 May 2021, from <https://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacin%20SIVICAP/2016%20Enfermedades%20%20vehiculizadas%20por%20agua%202015.pdf>.

Instituto Nacional de Salud. Enfermedades vehiculizadas por agua-EVA e índice de riesgo de la calidad en Colombia-IRCA, 2014. Bogotá,D.C.Colombia.2015.

INSST, I. (2017). Insst.es. Retrieved 3 June 2021, from <https://www.insst.es/documents/94886/353183/Cryptosporidium+spp++A%C3%B1o+2018.pdf/24cf8483-23d8-40de-9514-d0ae5c9a8a1k?version=1.1&t=1548635368033>.

Javeriana, U. (2018). Lista de precios, servicios de laboratorio. Ingeniería.javeriana.edu.co. Retrieved 8 May 2021, from <https://ingenieria.javeriana.edu.co/documents/7508381/0/Lista+de+Precios+laboratorios+2018-1.pdf/0e7d3403-5fb1-4360-9c62-7bbbd9474ac>.

Lloret, A. (1993). Seimc.org. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/>

micologia/dermatof.pdf.

LUCÍA OSPINA, M. L. O. M., MARTÍNEZ [MARTÍNEZ] (Director). (2022, 3 febrero). Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos ERIA y Plaguicidas. ins.org.co. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/evaluacion-de-riesgos-giardia-spp-y-cryptosporidium-spp-en-agua-para-consumo-humano.pdf>

Martin Ríos, A. 2002. Coccidiosis. Consultado el 25 de abril. 2021. disponible en <http://aviarioangelcabrera.com>.

Medina L. (1988) Prevalencia de *Cryptosporidium* en muestras fecales diarreicas en la ciudad de Medellín, estudio de 10 casos: Salud Uninorte. 1988; 4(1): 23-27 from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-00642018000100138#B22](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642018000100138#B22).

Mejía, F. (2019). ATLAS DE LAS CIUDADES DE RIOHACHA Y MAICAO. Osc.dnp.gov.co. Retrieved 5 May 2021, from [https://osc.dnp.gov.co/administrator/components/com\\_publicaciones/uploads/Atlas.de.las.Ciudades.de.Riohacha.y.Maicao.pdf](https://osc.dnp.gov.co/administrator/components/com_publicaciones/uploads/Atlas.de.las.Ciudades.de.Riohacha.y.Maicao.pdf).

Microsystem, L. (2021). Microscopios digitales — Microscopios de visualización en 3D. Leica microsystems.com. Retrieved 8 May 2021, from <https://www.leicamicrosystems.com/es/productos/>



microscopios-digitales/.

MINAMBIENTE, M. (2007). DECRETO NÚMERO 1575 DE 2007.

Minambiente.gov.co. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Disponibilidad-del-recurso-hidrico/Decreto-1575-de-2007.pdf>.

MINSALUD, A. (2019). ASIS. Minsalud.gov.co. Retrieved 13 May 2021, from [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Paginas/results.aspx?k=%20\(\(dcaudience:%22ASIS%20La%20Guajira%22\)\)](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Paginas/results.aspx?k=%20((dcaudience:%22ASIS%20La%20Guajira%22))).

MINSALUD, M. (2010). MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL MINISTERIO DE AMBIENTE. Minsalud.gov.co. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resoluci%C3%B3n%204716%20de%202010.pdf>.

MINSALUD, M. (2015). MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Minsalud.gov.co. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1615-del-2015.pdf>.

Morgan-Ryan, UM, A. Fall, L.A. Ward, N. Hijjawi, I. Sulaiman, R.

Fayer, R.C.Thompson, M. Olson, A. Lal, L. Xiao. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae from *Homo sapiens*). *Journal Eukaryot Microbiol* 49(6):433-450.

Montenegro, A. (2015). DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE MALEZAS EN CULTIVOS CUNDIBOYACENSES. Repository.ucatolica.edu.co. Retrieved 6 May 2021, from <https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/3202/4/DISE%C3%91O%20E%20IMPLEMENTACI%C3%93N%20DE%20UN%20SISTEMA%20DE%20DETECCI%C3%93N%20DE%20MALEZAS%20EN%20CULTIVOS%20CUNDIBOYACENSES.pdf>.

NAVA, G. (2011). ESTADO DE LA VIGILANCIA DE LA CALIDAD DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO. Ins.gov.co. Retrieved 7 April 2021, from <https://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacin%20SIVICAP/2012%20Estado%20de%20la%20vigilancia%20de%20la%20calidad%20del%20agua%202007-2011.pdf>.

Nodal, S. (2021). Grupos de riesgo. Visavet.es. Retrieved 30 May 2021, from <https://www.visavet.es/es/bioslab/grupos-de-riesgo.php>.

OTERO, J. (2004). Vista de Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotro-po rápido y PCR. Revistabiomedica.org, from <https://revistabiomedica>

.org/index.php/biomedica/article/view/1287/1402.

Pizarro, P. (2021, 2 junio). ¿Qué es un Microscopio Óptico? Cientec.  
<https://cientecinstrumentos.cl/que-es-un-microscopio-optico/>.

Pearson, R. (2020). Criptosporidiosis - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales. Manual MSD versión para profesionales. Retrieved 29 May 2021, from <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-intestinales-y-microsporidias/cryptosporidiosis>.

Platero, C. (2017). Visión Artificial: Técnicas de segmentación de imágenes. Ieef.upm.es. Retrieved 13 May 2021, from <http://www.ieef.upm.es/moodle/mod/resource/view.php?id=452>.

Reyes, M. (2009). Un complemento al teorema de nyquist. Scielo.org.mx. Retrieved 29 May 2021, from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfe/v56n2/v56n2a2.pdf>.

Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., & Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 35(2), 236-247.

Rivera, O., & Vásquez, L. R. (2006). *Cryptosporidium* SPP: Informe de un caso SPP: clínico en Popayán, Cauca. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 21(3), 225-229.

Rivero, Z., Bracho, A., Huerta, K., González, J., & Uribe, I. (2013). Prevalencia de coccidios y microsporidios intestinales en una comunidad indígena del estado Zulia, Venezuela. *Ve.scielo.org*. Retrieved 7 April 2021, from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S007552222013000200006#:~:text=Los%20coccidios%20y%20Microsporidios%20intestinales,inmunocompetentes%20\(1%2C2\).](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007552222013000200006#:~:text=Los%20coccidios%20y%20Microsporidios%20intestinales,inmunocompetentes%20(1%2C2).)

Rodríguez, F. (2019). Tinción diferencial de Ziehl-Neelsen - Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico. Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico. Retrieved 27 April 2021, from <https://www.franrzm.com/tincion-diferencial-de-ziehl-neelsen/>.

Rossanigo, C. E. (1986). Técnicas de diagnóstico de la Criptosporidiosis en la diarrea neonatal. *Vet. Arg.*, Vol. III (28): 768-775.

Rubio, J. 2008. Coccidiosis aviar: una actualización a los métodos de control. Laboratorio Hipra S.A. (en línea) Jornadas profesionales de avicultura 2008. Aranda de Duero. Consultado 27 abril. 2009. Disponible en [www.wpsa-aeca.com](http://www.wpsa-aeca.com).

SELMAN, J. (2004). Aplicaciones clínicas del procesamiento digital de imágenes médicas. Clc.cl. Retrieved 2 May 2021, from [http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/med\\_15\\_3/aplicacionesclinicas.pdf](http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/med_15_3/aplicacionesclinicas.pdf).

Standard methods for the examination of water and wastewater (Andrew D. Eaton, Eugene W. Rice, Vol. 23). (2017). [LIBRO]. Rodge B. Baird.

Superservicios, S. (2017). Retrieved 13 May 2021, from [https://www.superservicios.gov.co/sites/default/archivos/SSPD%20Publicaciones/Publicaciones/2018/Oct/ebook\\_calidad\\_de\\_agua-26-12-2017-vbibiana1.pdf](https://www.superservicios.gov.co/sites/default/archivos/SSPD%20Publicaciones/Publicaciones/2018/Oct/ebook_calidad_de_agua-26-12-2017-vbibiana1.pdf).

TELEDET, T. (2016). Um.es. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.um.es/geograf/sigmur/teledet/tema06.pdf>.

Tzipori, S. (1983) Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev., 47: 84-95.

VASQUEZ, I., RESTREPO, M., & BOTERO, D. (1986). Criptosporidiosis - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales. Manual MSD versión para profesionales. Retrieved 3 June 2021, from <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-intestinales-y>

-microsporidias/criptosporidiosis.

UMA, (2006). Universidad de Malaga. Manipulación Manual de Cargas, marzo del 2006 from: <https://www.uma.es/publicadores/prevencion/wwwuma/183.pdf>.

Vergara Castiblanco, C., Santos Núñez, S., Santos, F. F., & Mazás, A. (2000). La criptosporidiosis en la región andina de Colombia: seroprevalencia y reconocimiento de antígenos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 8, 373-379.

Vignau, M.L.; et al. 2005. *Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 1ra ed. Argentina

World Health Organization: WHO. (2023, 13 septiembre). Agua para consumo humano. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>: :text=El

Webmaster. (2022, 15 junio). En Colombia se presentan 12 millones de casos de gastroenteritis viral al año - Ecoopsos EPS SAS. Ecoopsos EPS SAS. <https://ecoopsos.com.co/en-colombia-se-presentan-12-millones-de-casos-de-gastroenteritis-viral-al-ano/>

Zarco, A. (2009). *Reconstrucción de Superficies*. Academia.edu. Retrieved 13 May 2021, from <https://www.academia.edu/44550722/>

Reconstrucci%C3%B3n\_de\_Superficies.

Zeiss, C. (2020). Microscopio Binocular Carl Zeiss, Modelo Primo Star, Aleman. - \$ 4.600.000. Artículo.mercadolibre.com.co. Retrieved 4 June 2021, from [https://articulo.mercadolibre.com.co/MCO-594362062-microscopio-binocular-carl-zeissmodelo-primostaraleman\\_JM?searchVariation=80156434498#searchVariation=80156434498&position=1&search\\_layout=stack&type=item&tracking\\_id=fb9267e8-51cf-4337-8c02-17b7fb403953](https://articulo.mercadolibre.com.co/MCO-594362062-microscopio-binocular-carl-zeissmodelo-primostaraleman_JM?searchVariation=80156434498#searchVariation=80156434498&position=1&search_layout=stack&type=item&tracking_id=fb9267e8-51cf-4337-8c02-17b7fb403953).