Capítulo 9
Sistema de adquisición de partículas biogénicas

Josué Álvarez Borrego
Mario Alonso Bueno Ibarra
María Cristina Chávez Sánchez

I. Introducción

En el año 2001, Pech Pacheco *et al.* propusieron un modelo capaz de solucionar la problemática de adquisición, procesamiento e identificación de partículas biogénicas, en el cual se basa el desarrollo de la plataforma computacional que se describe en este capítulo. Sin embargo, en la práctica este modelo no fue implementado como un sistema automático, por la carencia del equipo necesario para cumplir la tarea, sólo fue posible implementar un sistema semi-automático. No obstante, este modelo reunía los atributos funcionales para ser desarrollado tecnológicamente.

Bueno Ibarra (2005) diseñó e implementó un sistema completamente automatizado, esto tuvo como consecuencia que fuera posible conocer las limitaciones del modelo planteado anteriormente. El modelo propuesto por Pech Pacheco *et al.* (2001) procesaba imágenes monocromáticas de baja resolución, por lo tanto la problemática asociada a la eficiencia y al manejo de memoria de los procesos involucrados no era un aspecto evidente.

Los algoritmos implementados por el modelo anterior en el procesamiento de las imágenes monocromáticas de baja resolución, funcionaban con tiempos de procesamiento razonables, el costo de memoria no era alto, procesándose alrededor de 16 imágenes de 256 x 256 píxeles (64 Kb) cada una por evento, las cuales integraban varios campos capturados del microscopio; más adelante se describe el modelo planteado por Pech Pacheco *et al.* (2001). En el trabajo realizado por Bueno Ibarra (2005) se extendieron las capacidades planteadas y se rediseñó el modelo propuesto, con el objetivo de procesar imágenes de color en alta resolución.

I.1 Modelo base

El modelo planteado por Pech Pacheco *et al.* en el 2001 se muestra en la figura 1, en donde básicamente se seguían los procesos plasmados en el diagrama por cada espécimen analizado bajo el microscopio.

El proceso del modelo se inicia con la colocación de la muestra en el microscopio, continúa con la captura de un campo de la muestra, se le realiza cierto procesamiento de imágenes al campo, prosiguiendo con la integración de un mosaico de campos, y se continúa así sucesivamente hasta formar un tamaño de mosaico deseado; después, el mosaico es nuevamente procesado y segmentado; a partir del mosaico segmentado, se realiza un preanálisis de las partículas encontradas, para posteriormente tratar de identificar cada partícula individualmente por algún algoritmo de identificación. Una vez terminado este proceso, se continúa con el análisis de la siguiente muestra.

En el punto siguiente se detallan los procesos del modelo de la figura 1, explicando las características de cada algoritmo que es integrado en cada proceso.

I.1.1 Procesos involucrados en el modelo base

El análisis de partículas comienza con un grupo de especímenes que se desean identificar. Éstos se encuentran preparados en muestras colocadas sobre laminillas de vidrio, que se colocarán en la

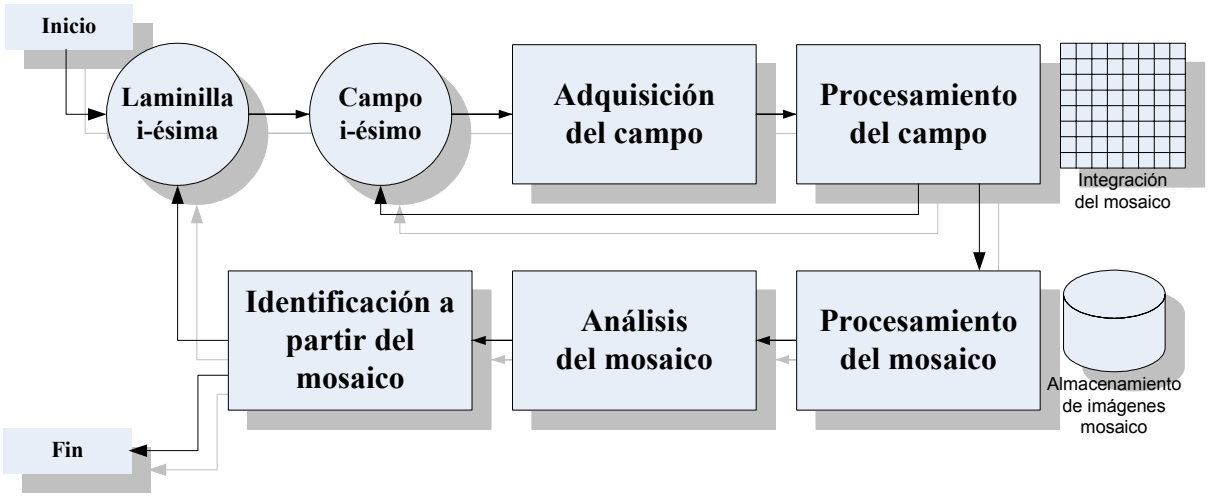

Figura 1. Modelo de adquisición, procesamiento e identificación automática de partículas biogénicas.

platina del microscopio. Este paso está marcado en el diagrama como *inicio*.

La muestra es colocada en una posición previamente seleccionada y se inicia con la *adquisición* del primer campo (donde el campo es el área que se observa en el microscopio en un objetivo determinado, 10x, 40x, 60x, 100x, etc.) y así se continúa barriendo la muestra hasta el i-ésimo campo, definido como $f(x,y)_i$, de esta manera se va formando una matriz de campos $M\ x\ N$, llamada *mosaico*, los cuales integran un área de análisis de la muestra y definida por $f(x,y)_{M\ x\ I}$. En la figura 2 se muestra la integración del mosaico con la captura de varios campos, los cuales forman la imagen completa del área que se desea analizar $f(x,y)_{M\ x\ N}$.

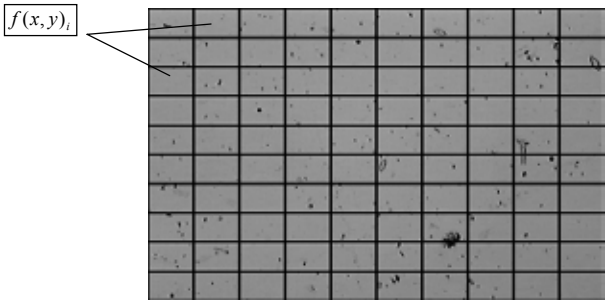

Figura 2. Formación del mosaico de campos capturados.

A cada campo $f(x,y)_i$ se le ejecuta un proceso de *autoenfoque*, ya que el microscopio captura en la misma posición espacial (x,y) varios campos a lo largo del eje Z; así, del proceso de autoenfoque es obtenida una imagen con la mejor información visual del campo capturado, dicha imagen está ubicada en el plano en Z de mejor enfoque.

Una vez que se ha obtenido la imagen mejor enfocada, se construye una imagen final del campo, por medio de la integración de un conjunto de imágenes capturadas a partir del plano de mejor enfoque. Lo anterior es realizado mediante unas técnicas llamadas *de fusión*, las cuales proveen una detección robusta y con mayor información espacial de las partículas que serán analizadas.

La ejecución del proceso de fusión se hace necesaria debido a que las partículas analizadas dentro de una muestra presentan una estructura volumétrica, y el proceso de fusión construye una imagen final a partir de la información contenida en las imágenes obtenidas en diferentes planos focales, deslizando la platina en el eje Z hacia arriba y abajo del plano de mejor enfoque. La técnica descrita es llamada *técnica de fusión multifoco*; así, la imagen final construida, llamada imagen fusionada, es representada por

$$(1) \quad f^*(x,y)_i = \sum_{1}^{Z} \left[f(x,y)_Z \right]_i$$

donde $f^*(x,y)_i$ es la imagen fusionada del campo i-ésimo y las imágenes $\left[f(x,y)_Z\right]_i$ son capturadas a diferentes planos focales del plano de mejor enfoque. En la figura 3 se muestra esta técnica, donde se tienen ocho imágenes capturadas a diferentes alturas en Z.

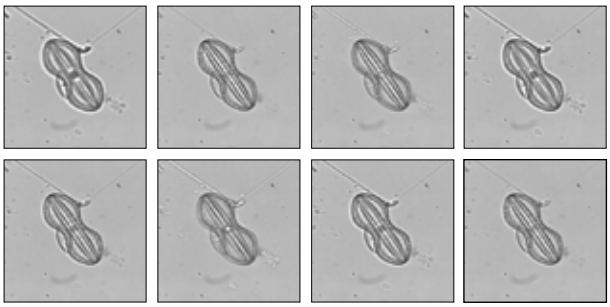

Figura 3. Las cuatro imágenes de la parte superior fueron capturadas hacia arriba del plano de enfoque, sobre el eje Z, mientras las imágenes de la parte inferior fueron capturadas hacia abajo del plano de enfoque, todas éstas forman la imagen fusionada.

Al aplicar la técnica de fusión se tiene una imagen final del campo $f^*(x,y)_i$ capturado con la información relevante de las imágenes que la forman. Esta técnica de fusión permite traer a un solo plano información adicional de los diferentes campos capturados en diferentes *Z*s, por lo tanto la imagen fusionada presenta la mejor calidad visual y de información, siendo ésta la que integre el mosaico de imágenes de la muestra.

En la figura 4 se muestra la imagen final de los campos fusionados capturados y mostrados en la figura 3. Los procesos explicados anteriormente se llevan a cabo en los bloques de *adquisición del campo* y *procesamiento del campo* (figura 1). Continuando con el *procesamiento del mosaico*, el mosaico formado contiene una serie de anomalías y defectos debido a las diferencias de iluminación y a las producidas por la misma técnica de fusión. En la figura 5 se observa el mosaico que presenta campos iluminados con diferentes intensidades, esto trae como consecuencia el tener que realizar un procesamiento de mejora en el mosaico formado $f(x,y)_{M\,x\,N}$. En el bloque de procesamiento del mosaico del modelo, son llevadas acabo tres etapas: la primera, una corrección de fondo de la imagen del mosaico; la segunda, una mejora de la imagen y la tercera, una segmentación.

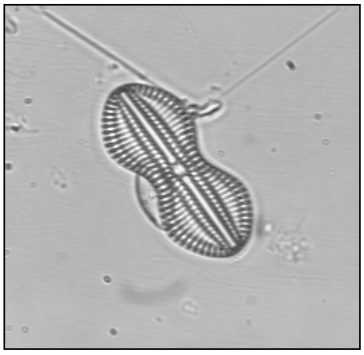

Figura 4. Imagen final fusionada.

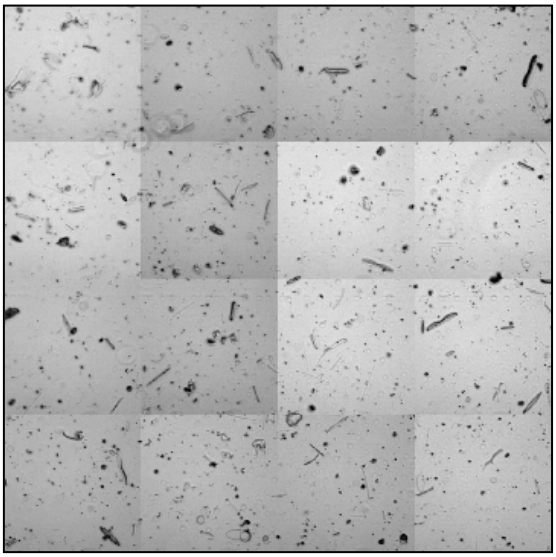

Figura 5. Mosaico con problemas de iluminación.

En la primera etapa es aplicada la técnica de *top-hat* o la técnica de *rolling ball* (Russ, 1995), para llevar a cabo una corrección del fondo. La operación de filtraje por *top-hat*, los píxeles cuyo valor exceda un umbral determinado son considerados ruido y serán reemplazados por el valor de la media o mediana de los píxeles vecinos, mientras que en la técnica de *Rolling Ball* considera que los píxeles más obscuros son los que van a ser eliminadas de la imagen.

En la segunda etapa se ejecuta la aplicación de un *filtraje paso bajo* en la imagen del mosaico resultante de la primera etapa; esto genera un suavizado en la imagen, produciendo que el histograma de ésta nos quede con una forma gausiana, permitiendo la aplicación de una técnica de segmentación ejecutada en la tercera etapa.

Por último, en la tercera etapa se aplica una técnica llamada *técnica del triángulo*, la cual ayu-

da a segmentar la imagen y así tener una nueva información en donde realizar una detección adecuada de las partículas. La técnica del triángulo consiste en la obtención de un valor de umbralización *T*, localizado en la distancia media de la recta de los valores extremos del histograma en donde la recta perpendicular a esta recta sea de longitud mayor (figura 6). Así el valor *T* obtenido será utilizado como valor de referencia para realizar la segmentación. En la figura 7 se muestra un ejemplo de la imagen resultante después de haber aplicado la técnica del triángulo.

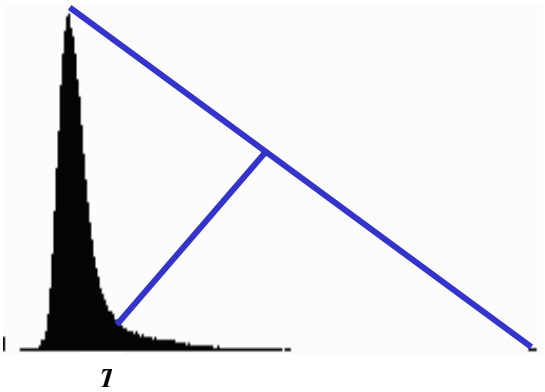

Figura 6. Método del triángulo, para segmentación.

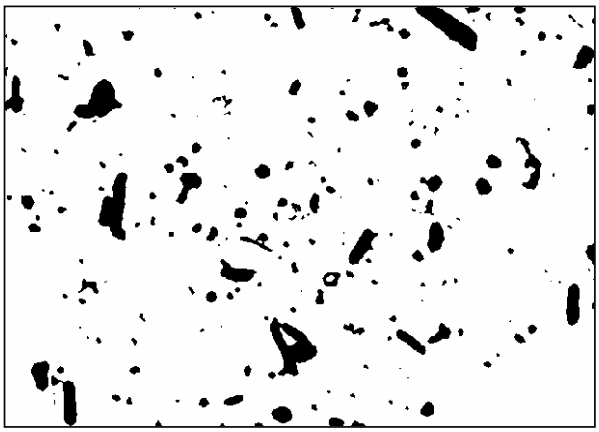

Figura 7. Mosaico segmentado, por el método del triángulo.

En el bloque de *análisis del mosaico* se realiza un análisis de la imagen del mosaico segmentado, con el objetivo de poder clasificar y detectar las partículas contenidas en la muestra. El proceso de análisis se llevará a cabo por medio de la ejecución de dos pasos: el primer paso consistirá en *detectar* y *localizar* las diferentes partículas contenidas en la muestra por medio de diferentes técnicas, y en el segundo paso se llevará a cabo un proceso de *etiquetado* de partículas previamente detectadas y localizadas.

Dentro de las técnicas para detectar partículas se mencionan las siguientes: *aproximación elíptica*, *análisis de ejes principales mayor y menor*, *análisis de tamaños*, etc., observe en la figura 8 cómo se lleva a cabo la detección de una partícula en un mosaico típico ya procesado, mediante las técnicas mencionadas anteriormente. Una vez que ya han sido detectadas las partículas, se les registra la ubicación almacenando las coordenadas dentro del mosaico.

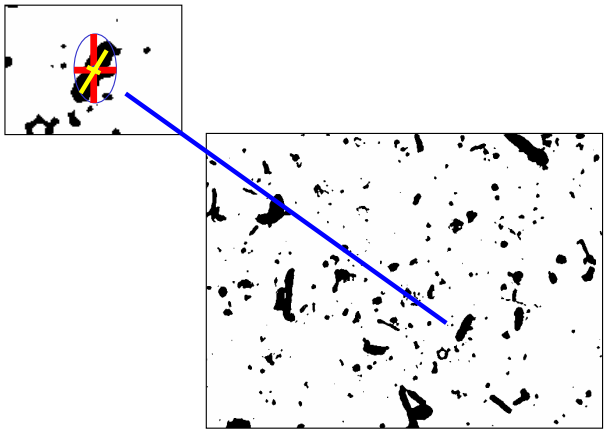

Figura 8. Detección y localización de partículas del mosaico.

En la figura 9 se muestra un ejemplo donde se han detectado y registrado las localizaciones de las partículas, prosiguiendo con la etapa de etiquetado.

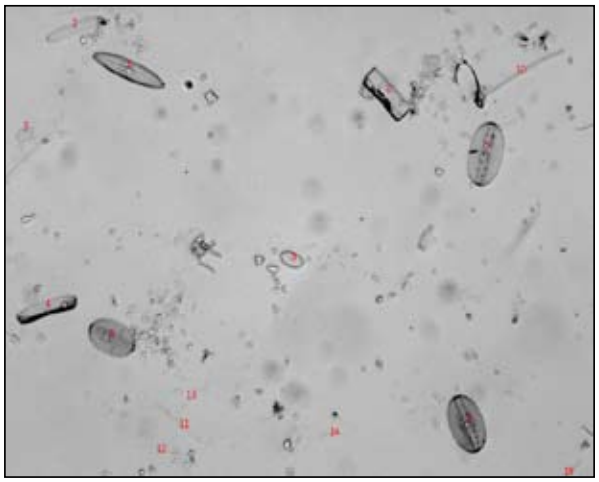

Figura 9. Etiquetado de las partículas, que fueron detectadas y localizadas.

Al momento de ejecutar esta etapa, se tiene almacenada la información de todas las partículas que son de interés. Lo que prosigue a continuación es realizar recortes de la imagen con todas aquellas partículas que previamente fueron marcadas como posibles candidatas de ser identificadas. En la figura 10 se muestra el recorte de partículas, los cuales serán utilizados en el proceso de identificación de partículas dentro del mosaico.

Figura 10. Recorte de todas las partículas que son candidatas para realizar una posible identificación.

Cuando las partículas ya han sido recortadas, se prosigue a comparar cada una de ellas con filtros (imágenes) previamente creados de las partículas que se desea identificar. El proceso de identificación es ejecutado por el bloque *identificación a partir del mosaico*; en este bloque se ejecutan tres técnicas: la primera de ellas es obtener la muestra transformada con una *invarianza de posición*, la segunda técnica es obtener la muestra con *invarianza de escala*, o sea con invariancias de tamaño, y por último, obtener la muestra con *invarianza de rotación*.

En el proceso de identificación se realiza una comparación entre los filtros que previamente se almacenaron de las partículas que se desean identificar; estos filtros no son otra cosa que muestras de partículas previamente transformadas con las técnicas mencionadas anteriormente. De este modo, la muestra que se ha transformado se compara con los valores de las imágenes transformadas previamente contenidas en los filtros.

Este proceso de comparación se lleva a cabo mediante la correlación entre los valores de las imágenes transformadas, lo cual es llamado proceso de *correlación invariante*; si la partícula es identificada, significa que el valor de correlación es muy cercano a uno, ya que los valores obtenidos son valores normalizados (valores entre 0 y 1).

Dentro de las técnicas de *correlación invariante* (IC) se han propuesto varias metodologías (Álvarez-Borrego y Chávez-Sánchez, 2001; Álvarez-Borrego *et al.*, 2002; Álvarez-Borrego y Castro-Longoria 2003), (Pech-Pacheco *et al.*, 2001, 2003), y dentro de estas técnicas de IC, se utiliza la técnica de *correlación de fase con filtros simples* (SFPC) y la técnica de *correlación de fase con filtros compuestos* (CFPC).

Todas estas técnicas han demostrado que incrementan la robustez en la identificación y el valor de discriminación entre partículas analizadas; además, estas metodologías integran dentro de sus algoritmos transformaciones con invarianzas a escala, posición y rotación. Como una observación adicional, estas técnicas han dado resultados altamente satisfactorios en la identificación de algunas partículas biogénicas.

Así, el modelo mencionado anteriormente sirvió como base para el planteamiento de un nuevo modelo, diseño y desarrollo de una nueva plataforma computacional. Sin embargo, se realizaron algunas adecuaciones importantes al modelo anterior para poder soportar los nuevos requerimientos de las tecnologías actuales referentes a la captura y manejo de imágenes, tales como son el manejo de imágenes de color e imágenes en alta resolución (imágenes mayores al mega-píxel).

En la siguiente sección se plasma y se explica ampliamente el modelo planteado, que cumple con los nuevos requerimientos y que soluciona algunos de los problemas encontrados en el primer modelo.

II. Desarrollo de una tecnología sistematizada computacional

En el desarrollo de esta nueva tecnología computacional se formulan algunas propuestas importantes, con el objetivo de expandir y optimizar el modelo anterior. La primera propuesta fue la simplificación general del modelo. Observemos la figura 11: básicamente se llevan a cabo dos

procesos generales, el proceso de adquisición y el proceso de análisis. Esta simplificación es importante porque se puede diseñar e implementar cada proceso por separado, trayendo una serie de ventajas y bondades que serán mencionadas conforme se vaya desarrollando esta sección.

La tecnología computacional desarrollada se centra en la integración dentro de la plataforma de un proceso automático de adquisición de imágenes. El producto resultante de este proceso será una imagen final, la cual contenga la mejor calidad visual y de información espacial, misma que será utilizada por el proceso de análisis. El proceso de análisis —como está definido en este contexto— no es parte integral del presente escrito; sin embargo, se mencionan y describen algunos algoritmos utilizados anteriormente en la identificación de partículas que han dado resultados satisfactorios en la identificación de algunas partículas biogénicas.

En la reorganización del modelo, se proponen tres modos de operación de la plataforma computacional, así como se proponen tres modos de adquisición de campos en Z y dos modos de barrido (movimiento de la platina) en X/Y.

Dentro de los modos de operación del sistema está el *campo unitario*, *mosaico (proceso no distribuido)* y *mosaico (proceso distribuido)*. Con respecto a los modos de adquisición de los campos en Z, se proponen los siguientes: *Z unitaria*, *Z unitaria con autoenfoque* y *Z multifoco*. Por último, con respecto a los modos de barrido de la muestra en X/Y se propone: *el barrido X/Y equidistante* y el barrido *X/Y por definición de matriz*.

Toda esta reestructuración de procesos surge por la necesidad de optimizar los recursos de cómputo, optimizar los tiempos de captura, operar con imágenes de alta resolución a color, tener la capacidad para la implementación y experimentación de nuevos algoritmos y, por último, tener la capacidad de adquisición y análisis de imágenes bajo el microscopio por medio de un multiproceso distribuido.

II.1. Modos de operación de la plataforma computacional

Cada uno de los modos de operación propuestos están diseñados para dar una solución a una problemática real con respecto a la forma de adquirir imágenes de partículas biogénicas a través del microscopio. La forma en que se abordará cada uno de los modos de operación se hará mencionando: la forma de utilización, la problemática que puede ser solucionada con el modo de operación respectivo y una explicación del diagrama respectivo, escribiendo algunos comentarios con respecto al modelo anterior, si hay algún punto de importancia.

Campo unitario

Este modo de operación está diseñado para la captura de campos de manera individual. El usuario se ubica dentro de la muestra y captura el campo deseado. El modo de campo unitario es un proceso semi-automático de adquisición y análisis de campos. Dentro de las bondades de este modo de operación, cabe mencionar las siguientes: 1. Identificación individual de campos: el usuario captura y da un nombre único al campo seleccionado; 2. Análisis individual de campos: el usuario captura los campos seleccionados y tiene la posibilidad de realizar un análisis individual de cada campo, según sea su requerimiento; 3. Puede formar una base de datos de campos por área de análisis, administrando el grupo de campos que está capturando, organizándolos en diferentes carpetas de trabajo; y 4. El usuario tiene la posibilidad de realizar un proceso de mejoramiento individual de las imágenes capturadas de los campos, corriendo el subproceso de *procesamiento de campo* para un campo en particular, mismo que podrá ser alimentado individualmente al proceso de análisis. En resumen, este modo de operación permite al usuario procesar un campo en particular según las necesidades requeridas; controlando cada proceso y subproceso individualmente, el usuario decide que subproceso correr; por otro lado, todos los procesos seleccionados son ejecutados en el mismo equipo de trabajo.

En la figura 11 se muestra el diagrama de procesos del modo de operación de campo unitario. La laminilla con la muestra es montada en el microscopio, después el usuario decide qué campo capturar, esto se realiza mediante el control de la platina por medio del *joystick* de movimiento, ubicándose en una coordenada X/Y; la captura del campo será realizada de acuerdo a los pará-

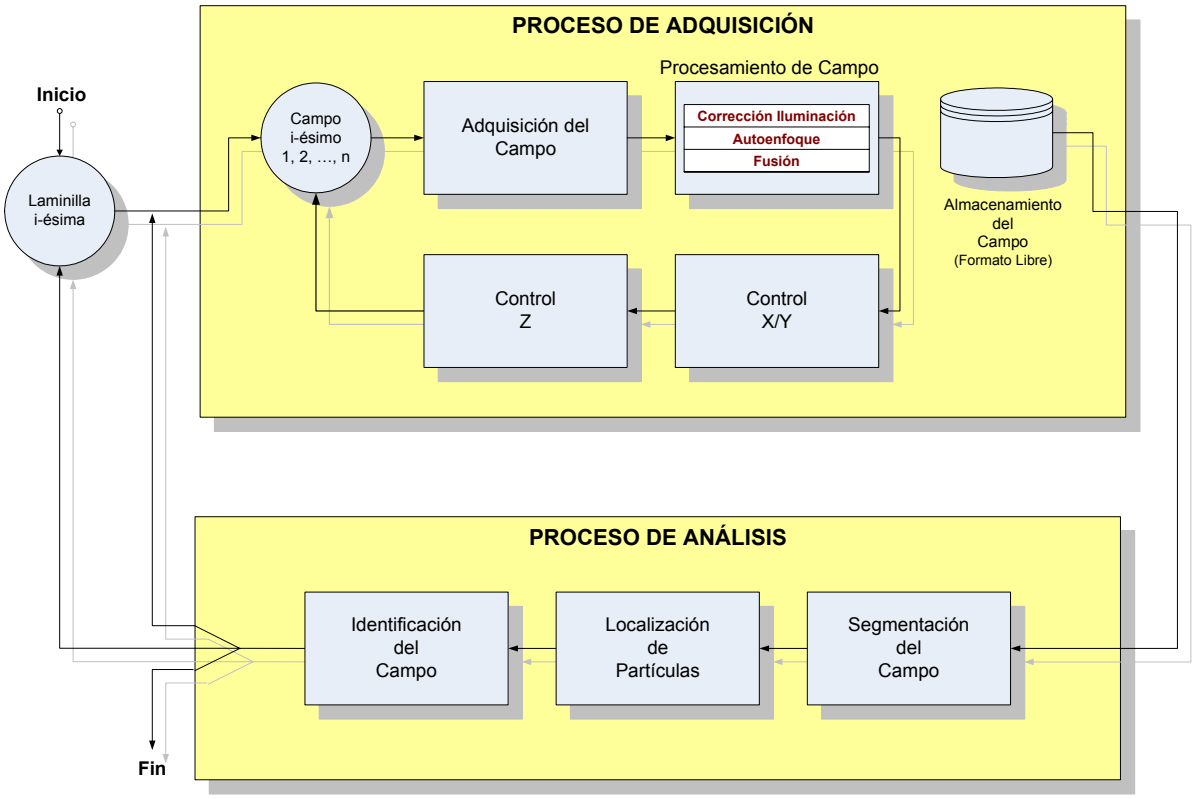

Figura 11. Diagrama de procesos del modo de Operación de Campo Unitario.

metros de control del modo de adquisición en Z, de esta manera comenzará la captura automáticamente; posteriormente, el usuario decide el tipo de análisis que le será realizado al campo, previamente capturado, dentro del proceso de análisis. Luego, el usuario podrá capturar otro campo de la misma muestra o, en su defecto, colocar y alimentar otra laminilla con otra muestra. Todos los campos capturados serán almacenados en sus respectivas carpetas en algún formato digital. Por conveniencia, el formato de trabajo es *BMP*.

Mosaico (proceso no distribuido)

Este modo de operación está diseñado para operar automáticamente. El usuario solamente define dos puntos inicialmente de captura en la muestra, un punto superior izquierdo y el otro punto en la parte inferior derecha de la lámina. Así, con estas dos coordenadas dentro de la muestra se define un área de adquisición de campos, los cuales serán capturados de acuerdo a los parámetros seleccionados de los modos de adquisición, explicados más adelante. Dentro de las bondades de este modo de adquisición está la factibilidad para procesar grandes volúmenes de información, sin cargar a la computadora con un gasto sumamente grande de memoria, como ocurría con el modelo propuesto por Pech Pacheco *et al*. (2001) al formar el mosaico. En este modo se capturan los campos formando un mosaico virtual, esto significa que el mosaico formado no es integrado físicamente en la memoria, como lo realizaba el modelo anterior. El modelo de Pech Pacheco *et al.* (2001) unía cada campo para formar una matriz sumamente grande en memoria, a esta matriz se le llamaba mosaico; de ahí —como se ha mencionado— se procesaba el mosaico. Sin embargo, en este modo —de igual forma que en el modelo anterior— se forma el mosaico, pero integrado en el medio de almacenamiento secundario y sólo se carga a memoria el campo que se esté procesando en ese momento; esto trae como consecuencia que se puedan procesar mosaicos de N x M campos de cualquier resolución y tamaño, sin tener que contar con una memoria de RAM muy grande, sólo la nece-

saria para poder procesar los campos individuales que forman la matriz del mosaico. El equipo utilizado en la experimentación y desarrollo de esta plataforma contiene 1 Gb de memoria, una cantidad de memoria que puede ser accesible en la actualidad.

Sin embargo, la desventaja de este modo de operación es la necesidad de contar con medios de almacenamiento secundario muy grandes, alrededor de 100 a 150 Gb, para procesar una muestra. Desventaja que ha sido solucionada con la aparición de los nuevos discos de almacenamiento secundario de hasta 450 Gb.

En la figura 12 se muestra el diagrama de procesos del modo de operación de mosaico con proceso no distribuido. En este modelo no se integra realmente el mosaico. No es necesario realizar el subproceso de corrección de iluminación, debido a que cada campo es procesado individualmente y por lo tanto hay un ahorro de tiempo. Los subprocesos de autoenfoque y fusión corrigen la imagen final; así, la imagen que fue obtenida puede entrar al proceso de análisis sin ningún problema, para continuar con la estrategia de análisis definida para la partícula biogénica que se está adquiriendo.

Por último, una de las ventajas que tiene este modelo actual es la factibilidad de poder programar cómo se van a adquirir los campos de la muestra, tanto en X/Y como en Z, con el objetivo de tener una imagen final de mayor calidad.

Mosaico (proceso distribuido)

Este modo de operación (figura 13) integra todas las ventajas de los dos modos anteriores. Por un lado, realiza el procesamiento de campos integrando el mosaico virtual y por el otro, es un modo de procesamiento completamente automático.

Dicho modo es una de las mayores contribuciones desde la perspectiva de la aplicación de este trabajo. El modo está diseñado para operar automáticamente y con procesos ejecutados en

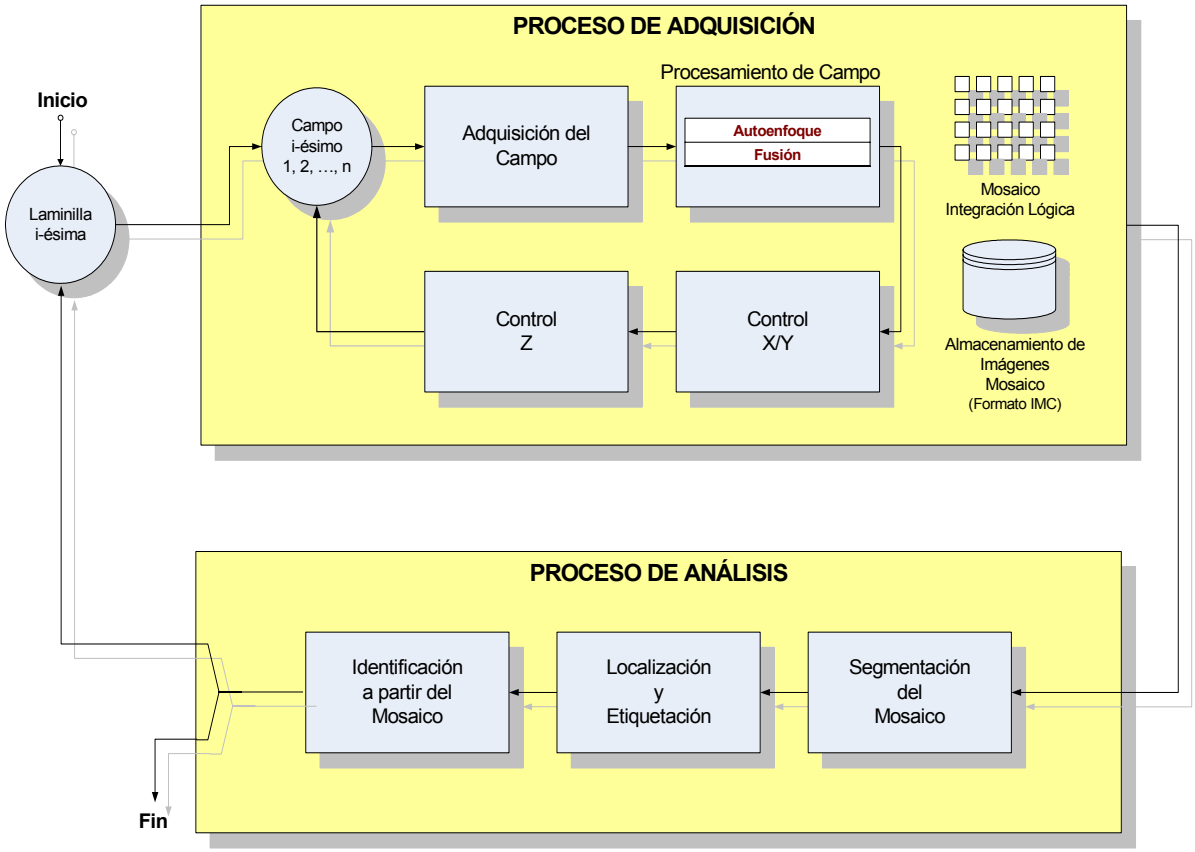

Figura 12. Diagrama de procesos del modo de Operación de Mosaico (proceso no distribuido).

forma distribuida, lo cual significa que se pueden estar capturando campos desde el microscopio, mientras que en otra computadora se están procesando los campos capturados, y en otra más se podrían estar analizando los mosaicos ya mejorados.

Otra bondad de este modelo es la posibilidad de adquirir muestras vía un alimentador de laminillas. Es posible colocar todas las muestras que se desean analizar en el magazín del alimentador y, con la plataforma, podrían adquirirse una a una cada laminilla hasta producir todas las imágenes de cada laminilla. En la actualidad sólo se puede procesar una laminilla a la vez, sin embargo en el diseño estructural del modo de operación está definido el poder integrar un control de este tipo.

La inicialización de este modo de operación es sumamente sencilla, solamente se define el área de adquisición promedio que será analizada de las muestras, vía la definición de dos puntos que conformará el área de análisis; posteriormente se define de cuántas imágenes será integrado el mosaico virtual, prosiguiendo con la definición, si se desea, de una captura en Z para cada campo, con el propósito de ejecutar un proceso automático de autoenfoque y fusión para cada campo que entrará al proceso de análisis.

Otros parámetros adicionales son: la definición del objetivo de captura y por último se realiza un proceso de inicialización de los límites de movimiento del microscopio para el movimiento en X/Y y el recorrido en Z, posteriormente se coloca la laminilla y automáticamente la plataforma capturará las imágenes respectivas de la laminilla analizada.

Desde de la perspectiva práctica del laboratorista encargado de procesar las muestras bajo el microscopio, este modelo es un avance significativo en la captura de imágenes. Actualmente los encargados del área tardan mucho tiempo en revisar toda la laminilla y en muchas ocasiones se pueden escapar a la visión algunas áreas de interés.

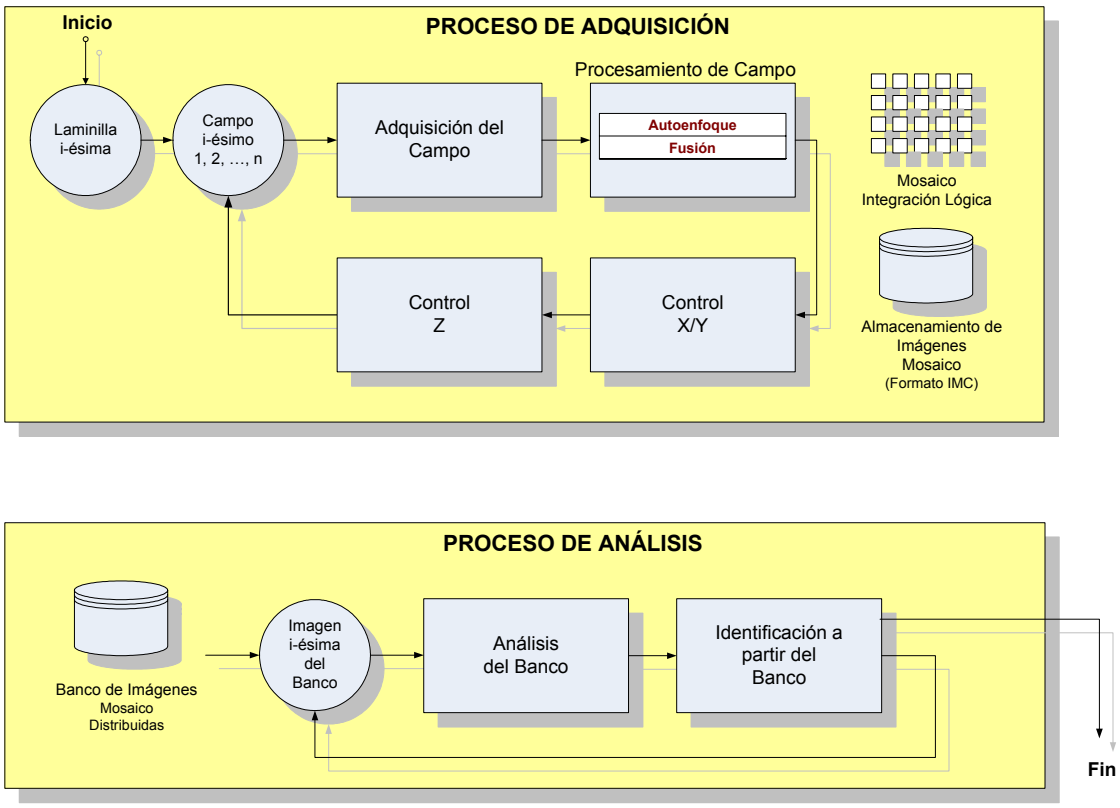

Figura 13. Diagrama de procesos del modo de Operación de Mosaico (proceso distribuido).

Así, para que el lector tenga una idea de lo que implica la búsqueda de una partícula típica, imagine que el área de una cancha de baloncesto es una muestra típica de histología que va a ser analizada, en donde se anda buscando una pelota de ping pong (equivalente a la búsqueda de un patógeno o una patología x), lo único que se puede observar a la vez de la cancha es el área de una lupa de 12 cm de diámetro con la que se revisará la cancha (equivalente al objetivo x). Como puede suponer, simplemente recorrer toda la cancha sería ya un problema, revisarla es otro problema mayor; pero si se le agrega que la pelota de ping pong puede estar elevada en el aire y con la lupa sólo puede observar 5 cm de altura en cada posición que se revise, entonces se necesitaría que la lupa recorriera diferentes alturas desde el piso para visualizar otras alturas. Ahora imagine que la pelota de ping pong puede estar en una altura entre los 0 metros y los 2.5 metros. El problema de revisión es sumamente agotador. En la actualidad, así es como el personal de laboratorio realiza el proceso de revisión cuando se identifican en un campo las partículas buscadas. Por ejemplo, células infectadas con bacterias, cuerpos de inclusión de virus, etc. Significaría que la cancha hipotética de baloncesto está prácticamente saturada de pelotas de ping pong. Conclusión: el paciente está infectado o el tejido presenta una incidencia muy alta de patógenos.

A continuación se plantea una pregunta, ¿qué pasaría si la infección está en sus inicios?, es decir sólo hay un número mínimo de pelotas de ping pong en nuestra cancha, ¿cómo identificaría el personal de laboratorio esas partículas? La respuesta es simple: con los métodos de búsqueda actuales hay que realizar una búsqueda minuciosa, y a veces las pocas pelotas de ping pong se pueden escapar a la búsqueda en la laminilla.

Por lo tanto, este desarrollo realiza toda esa búsqueda y captura de forma automática, lo que se traduce en un ahorro considerable de esfuerzo, y sobre todo es una herramienta que puede ayudar a los expertos a ser más productivos, significando la posibilidad de detectar más rápidamente posibles cambios patológicos o simplemente tener la capacidad de procesar más muestras.

II.2. Modos de adquisición

Los modos de adquisición son los controles que contiene la plataforma para la captura de campos desde el microscopio para los movimientos en X/Y y Z, además controlan la forma de comportamiento de los servomotores del microscopio. Otra función es la de controlar los subprocesos de autoenfoque y fusión sobre una nomenclatura de nombres de campos previamente creada; esto es: cuando se selecciona alguno de los modos de adquisición, los archivos de las imágenes capturadas se guardarán con un nombre específico de acuerdo a una nomenclatura previamente diseñada. Por ejemplo, si se utiliza el modo de adquisición $1Z$ ($0\ \mu m$), la nomenclatura utilizada será el nombre de archivo que el usuario proveyó con una terminación "_001", el cual indica que sólo hay un campo en Z y es el número 001.

Así, dentro de la plataforma desarrollada hay tres modos de adquisición para el movimiento en Z y dos modos de adquisición para el movimiento en X/Y de la platina.

Modos 1 Z ($0\ \mu m$) y 1 Z (autoenfoque por sistema)

Estos dos modos de adquisición capturan sólo una imagen del campo en donde esté ubicado en X/Y el microscopio en ese momento, el modo *1 Z (0 μm)* adquiere un solo campo ubicado en el foco, donde previamente el usuario busca manualmente el foco de la muestra.

En el modo *1 Z (autoenfoque por sistema)*, se captura de forma similar que en el modo anterior sólo un campo, la diferencia estriba en que el sistema realiza una búsqueda de la altura en Z, donde se encuentre el foco; sin embargo, la platina debe ser colocada manualmente a una altura en Z de referencia, próxima al foco. El algoritmo de control del autoenfoque del sistema tiene un comportamiento similar a un autoenfoque por análisis de varianza, sin embargo no son proveídos los algoritmos en que se basan las rutinas de autoenfoque del microscopio Leica (es un sistema cerrado). En pruebas realizadas el algoritmo no es robusto, la ubicación en Z se perdió al buscar el foco y el tiempo de enfoque fue sumamente largo para una muestra simple bien contrastada.

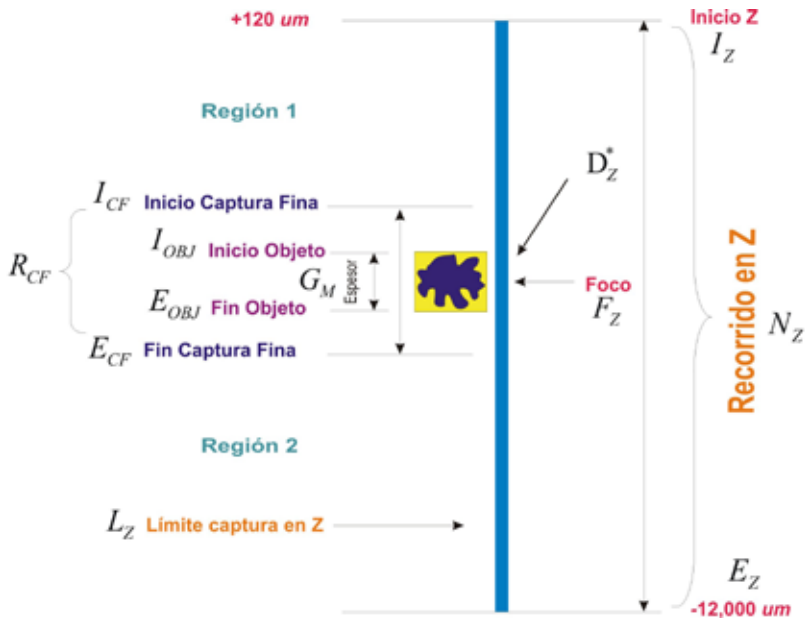

Figura 14. Modo de adquisición *n Z (Multifoco)*.

Estos dos modos de control son para operar capturas de muestras rápidamente. Usualmente son seleccionados estos modos cuando se utiliza con el modo de operación de campo unitario, es decir cuando el usuario desea capturar una muestra que está observando en ese momento.

Modo n Z (Multifoco)

Este modo es otra contribución importante, el modo *n Z (Multifoco)* está diseñado para asegurar dos aspectos importantes: el primer aspecto asegura que la imagen mejor enfocada será la obtenida por el subproceso de autoenfoque, donde ésta va a contener la información más relevante de la muestra y además la mejor calidad visual; el segundo aspecto es que se asegura que a la partícula analizada se le capturen todos los planos focales necesarios para obtener la información total necesaria para el análisis.

Una de las bondades de este modo es que no se necesita una Z de referencia que tenga que ser alimentada cada vez que se captura un campo, sólo es necesario proveer los límites del recorrido en Z de la platina y el foco de la muestra inicial que se vaya analizar; sin embargo, cabe mencionar que el proveer el foco es sólo por razones de eficiencia, realizándose sólo una vez en la inicialización del microscopio.

En la figura 14 se muestra el diagrama de operación de este modo de adquisición. La barra azul indica el recorrido en Z de la platina, recorriendo desde las -12,000 μm. (12 mm, parte inferior hasta las $+120$ μm. (parte superior), con 0 μm. en el foco F_Z inicial. Por lo tanto, inicialmente se indican tres valores en el control interno del microscopio: el primer valor, el límite inferior de recorrido de la platina E_Z (-12,000 μm.); el segundo valor, límite superior I_Z ($+120$ μm.) y el tercer valor, el foco inicial de la muestra F_Z (0 μm.), los valores inicializados son posiciones absolutas dentro del "*hardware*" del microscopio.

La idea primordial en el diseño de este modo es que el microscopio hiciera un barrido fino en la región definida como región de captura fina (donde se encuentra la muestra), delimitada por I_{CF} y E_{CF} (en esta región el paso de captura es proveído por el usuario en el orden de $0.1 \le D_Z^* \le 1.0$ μm., dependiendo de las características de la partícula). El espesor de la región de captura fina R_{CF} también es alimentado por el usuario, esto con el objetivo de controlar qué tantas imágenes van a ser capturadas a partir del grosor de esta región; un valor típico del tamaño de la región de captura fina es $R_{CF} = 2R_{CF}^* + G_M$ um., donde $R_{CF}^* = 20$ um.

Otro valor que también es suministrado por el usuario en N_Z es el número de planos total

en Z que desea capturar para un campo (valores típicos son 100 planos focales); sin embargo si el usuario provee un número menor de planos a capturar, el sistema ajusta al mínimo valor de planos que deben ser capturados, para asegurar la integridad del subproceso de autoenfoque y de fusión.

Por último, el grosor promedio de la muestra analizada debe ser proveído por el usuario, esto para calcular todas las demás variables que debe utilizar el modo para adquirir imágenes en Z. El grosor está representado por la variable G_M.

Una vez proveídas las variables mencionadas, las siguientes variables son calculadas: la primera es posición inicial en Z de la partícula, dada por $I_{OBJ} = \frac{G_M}{2} + F_Z$; el límite donde termina el cuerpo de la partícula calculado por $E_{OBJ} = I_{OBJ} - G_M$; el inicio de la región de captura fina, dada por $I_{CF} = I_{OBJ} + R^*_{CF}$; el final de la región de captura fina, $E_{CF} = E_{OBJ} - R^*_{CF}$ y por último el límite de captura en Z, calculado por $L_Z = F_Z - 200$.

Dos regiones adicionales son barridas, las regiones 1 y 2, en las cuales también se realiza una captura de campos, sólo que el paso en Z es mayor que en la región fina. Las ecuaciones que calculan estas regiones son $N_{CF} = \frac{R_{CF}}{D^*_Z}$, $N_{\text{Región 1}} = N_{\text{Región 2}} = \frac{N_Z - N_{CF}}{2}$.

Modo X/Y

Una vez definidos los parámetros de control de Z, se capturan los planos focales; sin embargo, todo el proceso mencionado anteriormente es ejecutado para una sola posición en X/Y, es decir: si se van a capturar 100 campos en Z, será sólo para un punto en la muestra en X/Y, por lo tanto la plataforma integra otro modo de adquisición para el control de los desplazamientos en X/Y.

Para este modo hay dos variantes: la primera es proveer los puntos iniciales (X_I, Y_I), (X_F, Y_F) y el número de campos deseados que se quieren capturar en X y Y, así el espaciamiento entre X y Y estará calculado por $\Delta x = \frac{X_F - X_I}{Núm.\,Campos\ X}$ y $\Delta y = \frac{Y_F - Y_I}{Núm.\,Campos\ Y}$ respectivamente; la otra variante del modo es decirle al sistema que $\Delta x = \Delta y = 0$, por lo tanto se capturarán el número de campos seleccionado, sólo que a partir de (X_I, Y_I), con la posibilidad de no llegar a capturar hasta el punto (X_F, Y_F). En la figura 15 se muestran las variables referenciadas anteriormente.

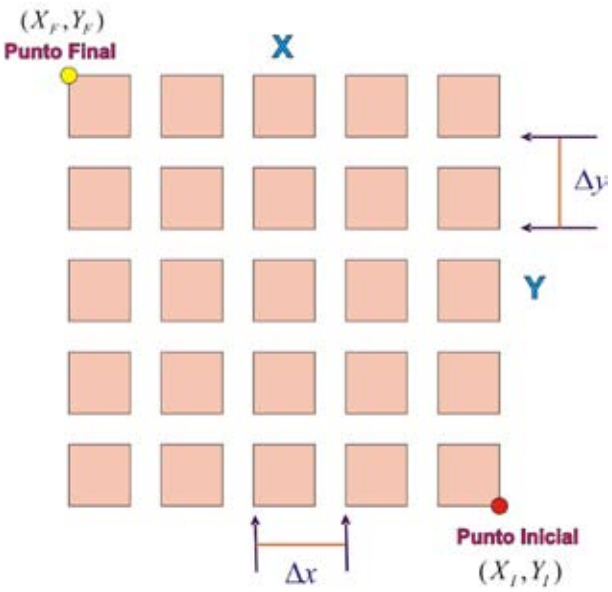

Figura 15. Modo de adquisición en X/Y.

II.3. Interfase de control

Básicamente, todo el control de lo mencionado anteriormente está integrado en una interfase que el usuario puede manipular. En la figura 16 se muestra la interfase de control de la plataforma computacional.

Cinco secciones están contenidas en la interfase: la primera sección es utilizada para la inicialización de la platina; la sección dos es para la selección del modo de adquisición para Z; la sección tres controla el modo de adquisición para X/Y y el objetivo de captura; la sección cuatro es para la identificación de los campos en el medio de almacenamiento y la carpeta o directorio donde serán almacenadas las imágenes; y por último, la sección cinco es para controlar manualmente la posición de la platina. Brevemente se explicarán los controles de la interfase para operar la adquisición de imágenes en los diferentes modos de operación mencionados anteriormente.

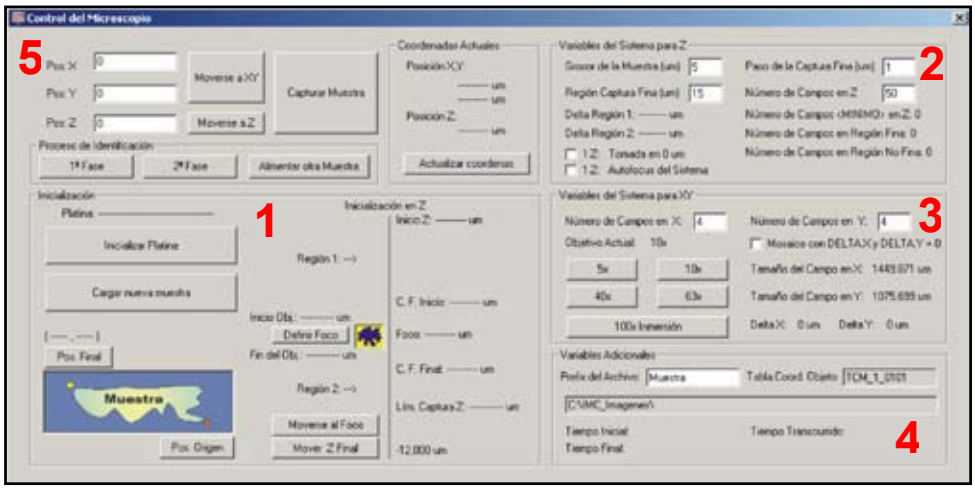

Figura 16. Interfase de control de la plataforma computacional.

Sección 1

En la figura 17 se muestra la primera sección de control. En esta sección se inicializa el microscopio y platina. Los botones de control son los siguientes: el botón de *Inicializar Platina* identifica el área de movimiento de la platina en X/Y; los botones *Pos. Final* y *Pos. Origen* son utilizados para identificar el área de análisis de la muestra; el botón *Definir Foco* es utilizado para identificar el foco de la muestra que se va a analizar; los botones *Moverse al Foco* y *Mover Z Final* son utilizados para mover la platina y revisar que las posiciones previamente definidas estén bien identificadas por el microscopio; por último, el botón *Cargar nueva Muestra* se utiliza para cuando se ha terminado de capturar imágenes de la muestra anterior y se desea colocar otra muestra, así mediante este botón no se pierde la inicialización previamente realizada. Este procedimiento sólo se realiza al inicio de un conjunto de capturas, desde un laminilla hasta *n* laminillas.

En el caso de muestras con formas diferentes, hay que escribir de nuevo la posición final y la posición del origen.

Sección 2

En la figura 18 se muestra la segunda sección de control. En esta sección se controla el modo de

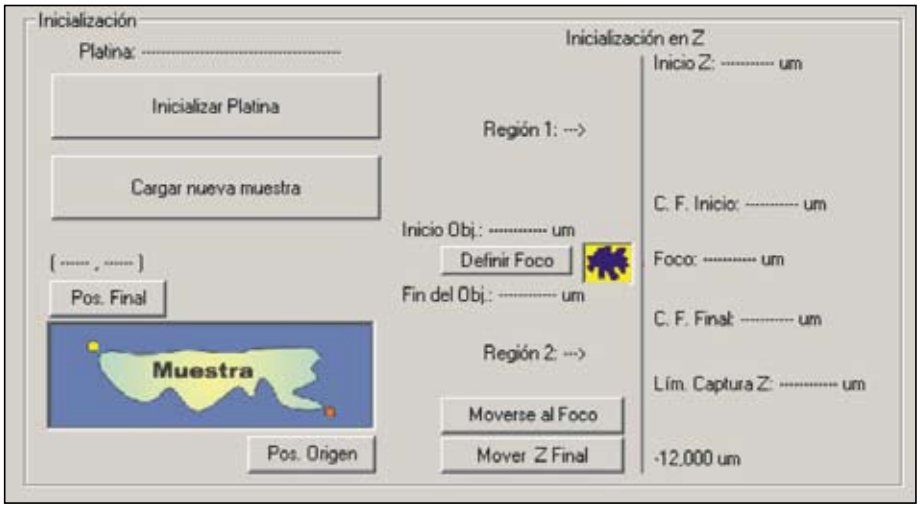

Figura 17. Interfase de control, sección primera.

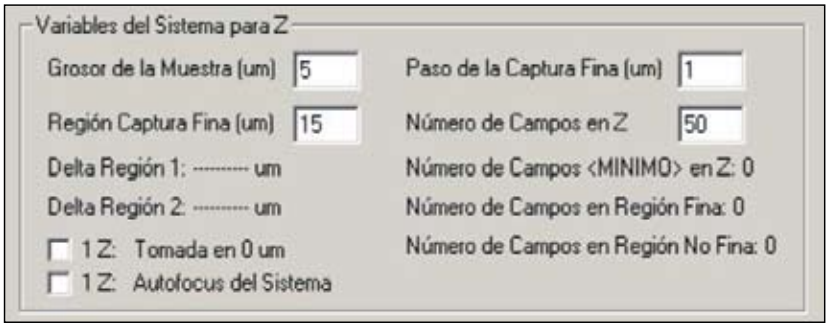

Figura 18. Interfase de control, sección segunda.

adquisición para Z. Los tres modos de adquisición para Z descritos anteriormente pueden ser controlados desde esta sección, marcando cualquiera de las *cajas de selección* (*check boxes*). Donde está la leyenda 1 Z, serían respectivamente la adquisición de una imagen solamente en Z, *Tomada en el Foco* y la adquisición vía el *Autoenfoque del Sistema*. Sí no hay marca en las cajas de selección, como se muestra en la figura, la opción de *n*Z (Multifoco) es seleccionada, donde se muestran los cuatro parámetros explicados previamente respecto a este modo de adquisición: uno es el grosor de la muestra G_M; el grosor de la región fina, tanto antes como después de la partícula, usualmente definida por $R^*_{CF} = 20$ um.; el incremento en Z para la captura del siguiente plano focal $0.1 \leq D^*_Z \leq 1.0$ y por último el número de planos que se desean capturar en todo el recorrido de Z, la variable N_Z. Así, suministrando estos parámetros, el sistema calcula y despliega el grosor de la *Región 1* y *2*, el número de planos mínimo que se capturarán, en el caso que no sean suficientes los suministrados por el usuario, el número de planos que serán capturados en la región fina y en la región no fina (región 1 y 2).

Sección 3

En la figura 19 se muestra la tercera sección de la interfase. En esta sección se controla el modo de adquisición en X/Y. Para controlar X/Y con una separación $\Delta x = \Delta y = 0$, marcar el control *Mosaico con DELTA.X y DELTA.Y = 0*, haciendo que la platina se comporte de acuerdo a lo mencionado, es decir captura una matriz de campos sin separación entre ellos. Por otro lado, el control del número de campos que van a ser capturados en la matriz de campos, se inicializa por medio de los cuadros de texto *Número de Campos en X* y *Número de Campos en Y*.

Dependiendo de la amplificación que se desea utilizar para el análisis de la muestra, se utilizan los botones 5x, 10x, 40x, 63x y 100x, sólo hay que presionar el botón correspondiente para seleccionar el objetivo respectivo para la adquisición de las imágenes.

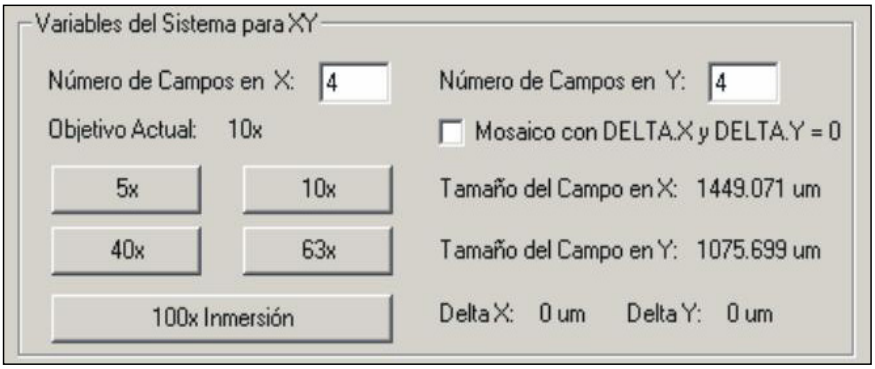

Figura 19. Interfase de control, sección tercera.

Cuando se inicializan los controles respectivos, el sistema responde mostrando el valor de Δx y Δy, calculados de acuerdo al objetivo utilizado y a los puntos del área de barrido de la muestra, seleccionados en la sección 1.

Sección 4

En la figura 20 se muestra la cuarta sección de control. En esta sección se controla la forma en que se identifican los campos grabados en el medio de almacenamiento. El usuario puede utilizar un prefijo para el nombre de la muestra y el sistema completará el nombre completo, de acuerdo a los parámetros seleccionados anteriormente por el usuario.

Otra información mostrada en la sección es la del directorio o carpeta que, por configuración, el sistema utiliza para la ubicación de todos los archivos capturados. Por último, se muestra el tiempo utilizado en la captura, con el fin de calcular los tiempos para la alimentación de muestras adicionales. Los otros controles no mencionados son utilizados para aplicaciones especiales no incluidas en este escrito.

Sección 5

En la figura 21 se muestra la quinta sección de control. En esta sección se controlan los movimientos de la platina por la asignación de coordenadas, usualmente esta sección es para que el usuario se posicione en una partícula que previamente ya había sido identificada; así, proveyendo las coordenadas en X, Y y Z, se puede ubicar en una localización en el espacio.

El botón de *Actualizar coordenadas* es sólo para visualizar las coordenadas actuales de la platina y por consiguiente su ubicación, es sólo un botón de notificación de coordenadas. El botón de *Capturar Muestra* es utilizado para la captura del campo actual de la muestra analizada. Los otros controles no mencionados son utilizados para aplicaciones especiales no incluidas en este escrito.

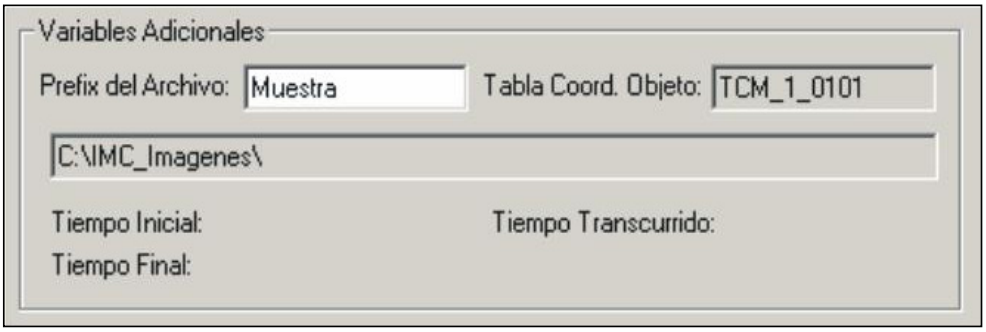

Figura 20. Interfase de control, sección cuarta.

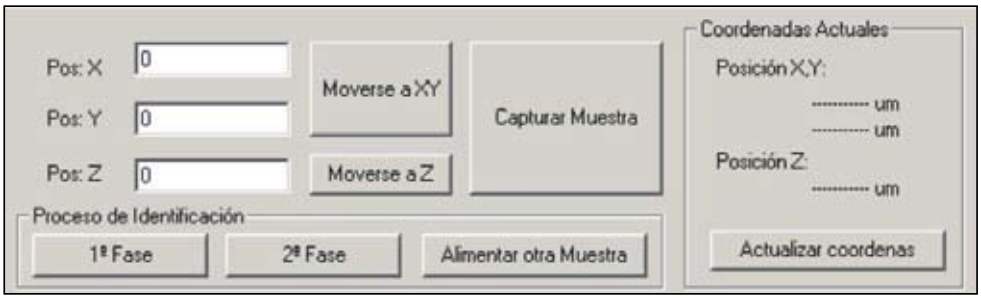

Figura 21. Interfase de control, sección quinta.

III. Bibliografía

Álvarez-Borrego, Josué y María Cristina Chávez Sánchez (2001) "Detection of IHHN virus in shrimp tissue by digital color correlation". *Aquaculture*, 194(1-2): 1-9.

Álvarez-Borrego, J., R. Mouriño Pérez, G. Cristóbal Pérez y J. Luis Pech Pacheco (2002) "Invariant recognition of polychromatic images of *Vibrio cholerae* 01". *Optical Engineering*, 41(4): 827-833.

Álvarez-Borrego, J, y E. Castro-Longoria (2003) "Discrimination between *Acartia* (Copepoda: Calanoida) species using their diffraction pattern in a position, rotation invariant digital correlation". *Journal of Plankton Research*, 25(2): 229-233.

Bueno Ibarra, Mario Alonso (2005) "Desarrollo de una Tecnología Sistematizada para la Adquisición de Partículas Biogénicas". Tesis de doctorado. Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica Unidad Culhuacán (ESIME), Instituto Politécnico Nacional (IPN), A030369, México, 2 de junio.

Pech Pacheco, J. L., Gabriel Cristóbal, J. Álvarez-Borrego y Cohen-León (2001) "Automatic System for Phytoplanktonic Algae Identification". *Limnética*, 20(1): 143-158.

Pech Pacheco, J. L., Josué Álvarez-Borrego, Gabriel Cristóbal y Matthias Keil (2003) "Automatic object identification irrespective to geometric changes". *Optical Engineering*, 42(2): 551-559.

Russ, J. C. (1995, 2ª ed.) *The Image Processing Handbook*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.