CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ÓPTICA CON ORIENTACIÓN EN OPTOELECTRÓNICA

Identificación del virus de la mancha blanca en tejido de camarón: procesado de imágenes y correlación no lineal

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Roberto Castro López

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por

Roberto Castro López

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Josué Álvarez Borrego
Director del Comité

Dra. Diana Tentori Santa Cruz
Miembro del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Heriberto Márquez Becerra
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador
del Posgrado en Ciencias en Óptica

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Octubre ,2014

Resumen de la tesis que presenta Roberto Castro López como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Identificación del virus de la mancha blanca en tejidos de camarón: procesado de imágenes y correlación no lineal.

Resumen elaborado por:

Roberto Castro López

El virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) es una enfermedad del camarón altamente contagiosa con mortalidades de hasta el 100% en un lapso de 3 a 10 días después del contagio. Cuando el camarón entra en estrés debido a una mala planeación y un mal manejo (cambios de temperatura en el agua, cambios en la salinidad del agua, sobrepoblación en los estanques) de las granjas acuícolas puede ser susceptible a este virus. También lo puede adquirir vía oral o de madre a hijo. Los síntomas a simple vista son manchas blancas circulares de unas cuantas micras de diámetro compuestas por calcio, color rojizo en ciertas partes del cuerpo del camarón, poca ingesta de alimento y movimientos erráticos en el estanque.

En el presente trabajo se estudia e implementa una metodología para identificar el virus de la mancha blanca en tejido de camarón mediante el procesado de imágenes y proponiéndose tres nuevos tipos de densidades espectrales binarias. La técnica que se usa involucra varios procesos; utilización de un microscopio óptico, una cámara CCD y una computadora, se capturan y se almacenan pilas de imágenes ($f_s(x,y)_k$) en diferentes campos de tejidos de diferentes partes del cuerpo del camarón. Para cada pila de imágenes se utilizan métodos de autoenfoque y fusión. El método de autoenfoque selecciona la $f(x,y)_k$ (imagen) con mayor información mediante la de-correlación de Pearson entre las imágenes de la pila y una imagen fuera de foco (adquirida intencionalmente para este propósito). El método de fusión de imágenes consiste en fusionar los pixeles con mayor valor en el espectro de Fourier de las imágenes a partir de la imagen mejor enfocada $f_{BF}(x,y)$, es decir, compara pixel por pixel el contenido de frecuencias de la imagen mejor enfocada con cada imagen de la pila, obteniendo una imagen 2D final para cada pila de imágenes con los detalles finos de cada campo del tejido de camarón (se obtiene una imagen con los mejores pixeles).

Con la ayuda de un experto en la identificación del virus de la mancha blanca del camarón y un proceso de segmentación aplicado a las imágenes fusionadas, se obtiene un banco de filtros (una base de datos), compuesto por las densidades espectrales binarias y las firmas espectrales de las morfologías más relevantes de los cuerpos de inclusión del virus de la mancha blanca del camarón. La densidad espectral binaria es obtenida mediante la parte real de la transformada de Fourier Ley k de la imagen y una condición matemática. Un objetivo de esta investigación es obtener nuevos tipos de densidades espectrales binarias que nos ayuden a la

identificación del virus de la mancha blanca del camarón. La primer densidad espectral binaria propuesta se obtiene invirtiendo la condición matemática de la densidad espectral binaria existente, la segunda se obtiene mediante la parte imaginaria de la transformada de Fourier Ley k de la imagen y una condición matemática, y la tercera se obtiene invirtiendo la condición matemática de la segunda densidad espectral binaria propuesta, obteniendo así las tres nuevas densidades espectrales binarias.

Los resultados obtenidos con las tres nuevas densidades espectrales binarias, son semejantes a los ya existentes, llegando a la conclusión que los 4 tipos de densidades espectrales binarios tienen el mismo nivel de confianza de 95.4% en la identificación del virus de la mancha blanca del camarón manteniendo el mismo intervalo de confianza de índices espectrales $1.3853 \leq i^{ss} \leq 2.1143$.

Palabras clave**: densidad espectral, índice espectral, correlación no lineal.**

Abstract of the thesis presented by Roberto Castro López as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Optics with orientation in Optoelectronic.

Identification of white spot syndrome virus in shrimp tissues: image processing and nonlinear correlation.

Abstract by:

_____

Roberto Castro López

White spot syndrome virus (WSSV) is a highly contagious shrimp's disease with mortalities up to 100% within 3 to 10 days after exposure. When shrimp gets stressed due to poor planning and poor handling (changes in water temperature, change in water salinity and overpopulation in ponds) of aquaculture farms may be susceptible to this virus. Also it may acquire the virus orally or from the mother. The symptoms are circular white spots of a few microns in diameter composed of calcium, reddish in parts of shrimp body, low food intake and erratic movements in the pond.

In this work we studied and implemented a methodology to identify the white spot syndrome virus in shrimp tissues by image processing and proposing three new types of binary spectral densities. The technique used involves several processes; utilization an optical microscope, a CCD camera and a computer allowed the capture and storage of a stack of images ($f_s(x,y)_k$) from different tissue fields and different parts of the shrimp body. For each stack of images, autofocus and fusion methods were used. The autofocus method selects the $f(x,y)_k$ (image) with more information by Pearson non-correlation between the image in the stack and an out of focus image (intentionally acquired for this purpose). The method of image fusion consists in fusing the pixels with the highest value in the Fourier spectrum of the image, starting from the best focused image $f_{BF}(x,y)$, i.e., compares pixel by pixel the frequency content of the best focused image with each image on the stack obtaining a 2D image for each image stack, with the finest details for each fields on the shrimp tissue (an image is obtained with the best pixels).

With the help of an expert in identifying the white spot syndrome virus in shrimp and segmentation processes applied to the fused images, a filter bank (a database) composed of binary spectral densities and spectral signatures of the most relevant white spot syndrome virus inclusion body morphologies was obtained. The binary spectral density was calculated using the real part of the k-law Fourier transform of the image and a mathematical condition. An objective of this research was to obtain new types of binary spectral densities to identify the white spot syndrome virus of shrimp. The first binary spectral density proposal was obtained by inverting the mathematical condition of the existing binary spectral density, the second was obtained by the imaginary part of the k-law Fourier transform of the image and a mathematical condition, and the third was obtained by inverting the mathematical condition of the second binary spectral density proposal, obtaining three new binary spectral densities.

The results obtained with the three new binary spectral densities were similar to existing ones, this allowed us to conclude that the four types of binary spectral densities have the same trustfulness level of 95.4% in identifying the white spot syndrome virus of shrimp keeping the same interval spectral index $1.3853 \leq i^{ss} \leq 2.1143$.

Keywords: **spectral density, spectral index, nonlinear correlation.**

Dedicatorias

A mi esposa Diana Karina, por su amor, apoyo, comprensión
y palabras de aliento, que me ayudaron a salir
adelante para cumplir una meta
más en mi vida. Te amo.

A mis hijas Hazul y Lya que siempre estuvieron
apoyándome con su amor y cariño.
.

A mis padres Edgardo y Egeria, por darme la vida,
por estar siempre conmigo apoyándome
a seguir adelante.

A mis hermano Egeria, Edgardo y Alejandro,
por su ayuda y consejos.

Agradecimientos

A mi esposa e hijas Diana Karina, Hazul y Lya, por acompañarme a cumplir una meta más en mi vida, por su amor, sus consejos, sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, por estar ahí cuando más los necesitaba, por su paciencia por el poco tiempo que pase con ellos.

Al Dr. Josué Álvarez Borrego, director de tesis, por confiar en mí y aceptarme en su grupo de trabajo, por su atención, su apoyo, su disposición a compartir sus valiosos conocimientos para la elaboración de este trabajo de maestría, por su amistad y ayuda incondicional.

A los miembros del comité de tesis, la Dra. Diana Tentori, Dra. Rosa Reyna Mouriño y el Dr. Heriberto Márquez, por su ayuda y consejos para lograr el término de este trabajo de maestría.

Al Centro de investigación científica de educación superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

Al CONACYT por otorgarme la beca para culminar mis estudios de maestría, así como también a su financiamiento del proyecto 169174*: "Reconocimiento de patrones en imágenes digitales mediante máscaras binarias de anillos concéntricos y firmas unidimensionales invariantes a posición, rotación y escalamiento"*. Ciencia básica SEP-CONACYT 2011.

A mis compañeros de cursos de maestría, Felipe Salcedo, Marco Arce, Carlos Pfeiffer y Esbanyely Garza, por sus consejos, por compartir sus conocimientos, por aceptarme en su grupo de estudio.

Tabla de contenido

Página

Resumen. ii

Abstract. iv

Dedicatorias vi

Agradecimientos vii

Lista de Figuras x

Capítulo 1. Introducción 1

1.1 Antecedentes 2

1.1.1 Transformada de Fourier 3

1.1.2 Propiedades de la transformada de Fourier 4

1.1.3 Filtro clásico de correlación 6

1.1.4 Filtro solo de fase 7

1.1.6 Filtro no lineal 7

1.2 Objetivo 8

1.2.1 Objetivos específicos 8

Capítulo 2. Metodología 9

2.1 Preparación de las imágenes. 9

2.1.1 Sistema de adquisición de imágenes 9

2.1.2 Autoenfoque por correlación de Pearson 10

2.1.3 Algoritmo de Fusión de imágenes 13

2.2 Algoritmo para calcular densidades espectrales binarias e índices de firmas espectrales del VSMB 17

2.3 Algoritmo para la detección del VSMB en tejido de camarón mediante correlación no lineal 25

2.3.1 Correlación no lineal y correlación no lineal adaptativa 28

Capítulo 3. Resultados 30

3.1 Autoenfoque de imágenes 30

3.2 Fusión de imágenes 31

3.3 Densidad espectral binaria e índice espectral 31

3.3.1 Primer propuesta 31

3.3.2 Segunda propuesta 32

3.3.3 Tercer propuesta 33

Contenido (Continuación)

Capítulo 4. Discusión 37
4.1 Autoenfoque y fusión de imágenes 37
4.2 Densidades espectrales binarias e índices espectrales 38
4.3 Correlación no lineal adaptativa 39

Capítulo 5. Conclusión 40

Lista de referencias 41

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Sistema de adquisición de imagen Multifoco. 11
Figura 2. Diagrama de flujo general del algoritmo de autoenfoque. 14
Figura 3. Patrón de procesamiento definido por los vectores V_q. 15
Figura 4. Diagrama de flujo de algoritmo de fusión. 18
Figura 5. Imagen dividida en sus respectivos canales RGB 19
Figura 6. Proceso de segmentación. 20
Figura 7. Obtención del índice de firma espectral. 21
Figura 8. Cuerpos de inclusión del VSMB. 22
Figura 9. Manchas en tejido de camarón sin VSMB. 23
Figura 10. Comparativas de VSMB. 24
Figura 11. Primera parte del diagrama de bloques del VSMB. 26
Figura 12. Segunda parte del diagrama de bloques del VSMB. 27
Figura 13. Tercera parte del diagrama de bloques de VSMB. 27
Figura 14. Tejido epitelio cuticular 28
Figura 15. Tejido epitelio y conectivo 29
Figura 16. Muestras de la pila de imágenes. 30
Figura 17. Imagen mejor enfocada. 31
Figura 18. Imagen final fusionada. 32
Figura 19. Resultados primer propuesta 33
Figura 20. Resultados segunda propuesta 34
Figura 21. Resultados tercer propuesta 35
Figura 22. Cuerpo de inclusión de VSMB. 35
Figura 23. Imagen problema con presencia del VSMB. 36
Figura 24. Pico de correlación. 36
Figura 25. Comparativa de imagen mejor enfocada a) e imagen fusionada b). 37
Figura 26. Gráfica de índices espectrales. 38

Capítulo 1. Introducción

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) asignó el VSMB al género Whispovirus, que pertenece a la familia Nimaviridae, como miembro único. Los viriones del VSMB son entre ovoides o elipsoides y baciliformes, tienen una simetría regular y miden 80 a 120 nm de diámetro y 250 a 380 nm de longitud (OIE, 2012). Actualmente está clasificada como una especie única (el virus del síndrome de las manchas blancas) dentro del género Whispovirus (Lo et al., 2012).

La Organización Mundial de Sanidad Animal ha catalogado al VSMB como la principal causa de grandes pérdidas en la población de camarones de granja (OIE, 2012). El VSMB es el virus más devastador conocido actualmente que afecta a la producción de camarón en las granjas acuícolas alrededor del mundo causando un gran impacto a la economía mundial (Walker, P.J., Mohan, C.V, 2009).

El VSMB fue diagnosticado en cultivos de camarón por primera vez en China y Japón en 1992 (Takahashi et al., 1994), sin embargo, por movimientos irresponsables de organismos acuáticos, a finales de 1995 se diagnosticó en Texas y Carolina del Sur en EU (Rosenberry B, 1996), expandiéndose a centro y Sudamérica a principios de 1999, así como también ha sido detectado en Europa (Rosenberry, B., 2003).

La acuicultura actualmente se practica en muchos países del mundo. Se considera como una actividad que se está desarrollando como complemento de la captura de organismos marinos y de agua dulce. El desarrollo más importante de la camaronicultura en México se localiza en el estado de Nayarit, Sinaloa y Sonora. En dichos estados, a mediados de 1995, enfermedades virales como el síndrome de Taura produjeron pérdidas económicas importantes en la industria acuícola del camarón blanco; ya que esta especie resultó ser susceptible a este virus. Actualmente el VSMB está teniendo gran impacto; ocasionando pérdidas tan severas en la industria acuícola de México, ocasionando que el precio del camarón se incremente un 300% en los últimos años y ha llevado al cierre de granjas camaronícolas dejando sin empleo a familias principalmente en los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora.

Los signos clínicos de campo reportados para la infección de VSMB son: 1) mortalidades rápidas y masivas, generalmente en juveniles, aunque puede afectar también a camarones adultos y 2) los camarones enfermos muestran manchas blancas acompañadas de coloración rojiza en todo el cuerpo (Kanchanaphum et al., 1998). El virus no solamente se limita al camarón cultivado en granja, sino también ha sido detectado en crustáceos silvestres, incluyendo cangrejos, langostas y camarones (Lo et al., 1996, Maeda et al., 1997).

1.1 Antecedentes

La identificación de objetos biológicos mediante el procesado de imágenes digitales es una herramienta que día a día con los adelantos tecnológicos va tomando el interés científico. El grupo de investigación a cargo del Dr. Josué Álvarez Borrego del centro de investigación científica de educación superior de Ensenada (CICESE) ha realizado trabajos de investigación mediante procesado de imágenes digitales para la identificación de objetos microscópicos y macroscópicos, invariantes a posición, rotación, escala y ruido, así como para objetos biológicos, “Identificación de diferentes estados de v*ibrio cholerae 01* mediante correlación a color” (Mouriño, 1999), “Análisis citogenético en tres especies de abulones de Baja California mediante procesamiento digital de imágenes” (Gallardo-Escárate, 2005), entre otros.

En las primeras investigaciones sobre enfermedades de camarones se utilizaban métodos de diagnóstico como montajes húmedos de tejidos infectados para microscopio óptico y métodos microbiológicos clásicos (Marges, 2004). La histología de rutina y la microscopía de transmisión electrónica, fueron incorporados como herramientas de diagnóstico para infecciones virales, por patólogos de camarones peneidos, en los años 70’s (Baxter et al., 1970, Couch, 1974).

En la actualidad los métodos de diagnóstico empleados por los patólogos de camarones son: observaciones clínicas, microscopía óptica directa, microbiología, histología de rutina y técnicas moleculares (Lightner and Readman, 1998).

Investigaciones previas para la identificación del VSMB en tejido de camarón trabajan mediante procesado de imágenes y correlación a color (Marges, 2004), así como

mediante técnicas moleculares como el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación del ADN de los productos del PCR, método del PCR Taqman en tiempo real, método de la hibridación *in-situ*, purificación del agente patógeno (OIE, 2012).

La metodología por correlación a color y filtro de fase obtiene un banco de filtros (una base de datos) de las diferentes morfologías más relevantes que presentan los cuerpos de inclusión del VSMB en tejido de camarón, el cual consta de la fase de la transformada de Fourier (filtro de fase) para cada canal del espacio de color RGB, de cada morfología que integre el banco de filtros.

Se obtiene la imagen problema (IP) donde se quiere identificar la presencia de VSMB, se obtiene la fase de la transformada de Fourier de cada canal del espacio de color RGB de la IP y se obtiene la correlación entre el filtro de fase de la IP y los filtros de fase del banco de filtros

Esta metodología produce una sensibilidad del 86.1% y especificidad del 2.71%, con un intervalo de confianza del 95%.

1.1.1 Transformada de Fourier

La transformada de Fourier es una herramienta que nos ayuda a pasar una señal del dominio espacial al dominio de frecuencias para facilitar su manipulación debido a que las operaciones en el dominio de frecuencias son más sencillas, por ejemplo, una imagen $f(x,y)$ está compuesta por pixeles y un conjunto de pixeles representa una frecuencia.

La transformada de Fourier de una función de dos variables $f(x,y)$ es

$$\mathfrak{F}\{g(x,y)\} = \iint_{-\infty}^{+\infty} g(x,y)e^{-i2\pi(f_x x + f_y y)}dxdy = G\left(f_x, f_y\right), \tag{1}$$

y la transformada inversa de Fourier está dada por

$$\mathfrak{F}^{-1}\{G(f_x, f_y)\} = \iint_{-\infty}^{+\infty} G(f_x, f_y) e^{i2\pi(f_x x + f_y y)} df_x df_y = g(x, y), \tag{2}$$

donde f_x y f_y son frecuencias espaciales.

1.1.2 Propiedades de la transformada de Fourier

En el procesamiento digital de imágenes las propiedades más importantes de la transformada de Fourier son:

1) Teorema de linealidad.- La transformada de Fourier de la suma de dos funciones es igual a la suma de las transformadas de Fourier de cada función

$$\mathfrak{F}[\alpha g + \beta h] = \alpha \mathfrak{F}[g] + \beta \mathfrak{F}[h], \tag{3}$$

donde α y β son constantes complejas, g y h son funciones de dos variables: $g(x, y)$ y $h(x, y)$.

2) Teorema de escalamiento.- La expansión de una función en el dominio espacial resulta en una contracción en el dominio de frecuencia (fx, fy). Si $\mathfrak{F}\{g(x, y)\} = G(f_x, f_y)$, entonces

$$\mathfrak{F}[g(ax, by)] = \frac{1}{|ab|} G\left(\frac{f_x}{a}, \frac{f_y}{b}\right). \tag{4}$$

3) Teorema de corrimiento.- Una translación de una función en el dominio espacial implica un corrimiento lineal de fase en el dominio de frecuencias. Si $\mathfrak{F}[g(x, y)] = G(f_x, f_y)$, entonces

$$\mathfrak{F}[g(x - a, y - b)] = G(f_x, f_y) e^{-i2\pi(af_x + bf_y)}. \tag{5}$$

4) Teorema de Parseval.- La integral del valor absoluto al cuadrado de una función es igual a la integral del valor absoluto al cuadrado de su transformada de Fourier. Si $\mathfrak{F}[g(x, y)] = G(f_x, f_y)$, entonces

$$\iint_{-\infty}^{+\infty} |g(x,y)|^2 dxdy = \iint_{-\infty}^{+\infty} \left|G\left(f_x, f_y\right)\right|^2 df_x df_y \,. \tag{6}$$

Estadísticamente la Ec (6) representa la varianza.

5) Teorema de convolución.- La convolución de dos funciones en el dominio espacial es igual a la multiplicación de las transformadas de Fourier individuales en el dominio de frecuencia. Si $\mathfrak{F}[g(x,y)] = G\left(f_x, f_y\right)$ y $\mathfrak{F}[h(x,y)] = H\left(f_x, f_y\right)$, entonces

$$\mathfrak{F}\left[\iint_{-\infty}^{+\infty} g(\xi,\eta)h(x-\xi, y-\eta)d\xi d\eta\right] = G\left(f_x, f_y\right)H\left(f_x, f_y\right). \tag{7}$$

Podemos expresar el teorema de convolución con las siguientes ecuaciones:

$$\mathfrak{F}[g(x,y) * h(x,y)] = G\left(f_x, f_y\right)H\left(f_x, f_y\right), \tag{8}$$

$$\mathfrak{F}[g(x,y)h(x,y)] = G\left(f_x, f_y\right) * H\left(f_x, f_y\right), \tag{9}$$

donde $*$ denota la convolución.

6) Teorema de autocorrelación.- Es la correlación cruzada de una función consigo misma. Si $g(x,y)$ es una función compleja y $\mathfrak{F}[g(x,y)] = G\left(f_x, f_y\right)$, entonces

$$\mathfrak{F}\left[\iint_{-\infty}^{+\infty} g(\xi,\eta)g^*(\xi-x, \eta-y)d\xi d\eta\right] = \left|G\left(f_x, f_y\right)\right|^2, \tag{10}$$

similarmente,

$$\mathfrak{F}[|g(\xi,\eta)|^2] = \iint_{-\infty}^{+\infty} G(\xi,\eta)G^*\left(\xi - f_x, \eta - f_y\right)d\xi d\eta, \tag{11}$$

donde el signo * indica que es el complejo conjugado de la función y $\left|G\left(f_x, f_y\right)\right|^2$ en la Ec (10) es el espectro de potencia, debido a que al multiplicar una función por su complejo conjugado obtenemos su espectro de potencia,

$$G\left(f_x, f_y\right)G^*\left(f_x, f_y\right) = \left|G\left(f_x, f_y\right)\right|^2. \tag{12}$$

Entonces la Ec (10) se puede expresar como:

$$g(x,y)\otimes g(x,y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} g(\xi,\eta)g^*(\xi - x, \eta - y)d\xi d\eta, \tag{13}$$

$$\mathfrak{F}[g(x,y)\otimes g(x,y)] = G\left(f_x, f_y\right)G^*\left(f_x, f_y\right), \tag{14}$$

donde el símbolo $\otimes$ denota una correlación.

1.1.3 Filtro clásico de correlación

Es un filtro diseñado en 1964 por Vander Lugt el cual trabaja en el plano de frecuencias y sirve para identificar patrones en sistemas ópticos o en sistemas digitales. Este sistema de correlación es óptimo desde el punto de vista de la relación señal a ruido, debido a la optimización de ésta en la salida, cuando el ruido de entrada es blanco (Kumar, B. Vijaya. and Hassebrook, L., 1990). Además, la respuesta al impulso del filtro de correlación es una réplica invertida de la señal de referencia, por lo que se le conoce también con el nombre de filtro de acoplamiento o CMF (*Classical Matched Filter*) por sus siglas en inglés. Las principales desventajas de este filtro de correlación son: poca eficiencia de luz en implementación óptica, picos de correlación muy anchos y lóbulos laterales grandes. La respuesta en frecuencia del filtro clásico está denotada por:

$$H(u,v) = \beta\frac{T^*(u,v)}{P_n(u,v)} = H_{CMF}(u,v), \tag{15}$$

donde $T^*(u,v)$ es el complejo conjugado de la transformada de Fourier de la imagen problema, β una constante arbitraria y $P_n(u,v)$ es la función de densidad espectral de potencia del ruido.

1.1.4 Filtro sólo de fase

En comparación con el filtro clásico, el filtro sólo de fase optimiza la eficiencia de luz y de entre todos los filtros con módulo unitario es el óptimo en la relación señal a ruido y en la relación pico-energía de correlación (*PCE: Peak-to-correlation energy*). El filtro sólo de fase o POF (*Phase only filter*) (Horner, J. L. and Gianino, P. D., 1984) está denotado por

$$H(u,v) = \frac{T^*(u,v)}{|T(u,v)|} = e^{-j\phi(u,v)}, \tag{16}$$

donde $\phi(u,v)$ es la fase de la transformada de Fourier de la imagen problema. A la salida de un filtro sólo de fase obtenemos un pico de correlación más estrecho que el CMF y tiene una mayor habilidad de distinguir entre patrones similares en una imagen que el CMF, debido a que atenúa las bajas frecuencias y realza las altas frecuencias; donde la transformada de Fourier de las altas frecuencias de una imagen está relacionada con los bordes y la forma del objeto (los detalles finos).

1.1.6 Filtro no lineal

Un filtro no lineal es un filtro cuya salida es una función no lineal de la entrada. La expresión para el filtro no lineal (ley k) está dada por (Kumar, B. Vijaya. and Hassebrook, L., 1990)

$$H_{NLF}(u,v) = |T(u,v)|^k e^{j\phi(u,v)}, \tag{17}$$

donde, $|T(u,v)|$, es el módulo de la transformada de Fourier del objeto que deseamos reconocer, k es el factor de no linealidad que toma valores $0 < k < 1.0$. Al variar los valores de k en este intervalo, podemos manipular las capacidades discriminantes del filtro y determinar el valor óptimo de k. Cuando el operador no lineal k modifica la transformada de Fourier tanto de la imagen problema como la de la imagen objetivo,

consideramos que tenemos un procesador no lineal. El filtro no lineal tiene ventajas comparado con los filtros clásicos acoplados, los filtros sólo de fase y otros filtros lineales; debido a su gran capacidad para discriminar objetos, su máximo pico de correlación está bien localizado y el plano de salida es menos ruidoso.

1.2 Objetivo

El objetivo general de este trabajo de investigación es la detección del virus de la mancha blanca en tejido de camarón mediante densidades espectrales binarias.

1.2.1 Objetivos específicos

a. Estudio y análisis de la metodología matemática de procesado de imágenes existente para detección del virus de la mancha blanca en tejido de camarón.

b. Desarrollo de nuevas densidades espectrales binarias para mejorar el algoritmo matemático de procesado de imágenes ya conocido.

c. Uso de la correlación no lineal como complemento para la identificación del virus de la mancha blanca en tejido de camarón.

Capítulo 2. Metodología

En este capítulo se expondrá la metodología estudiada y la metodología desarrollada para la identificación del VSMB mediante densidades espectrales binarias, índices espectrales y la implementación de la correlación no lineal para su identificación automática.

2.1 Preparación de las imágenes

Para obtener niveles de confianza aceptables en la identificación de patrones complejos, es necesario contar con imágenes de muy buena calidad debido a que éstas son las que nos ayudan a identificar nuestro objetivo. Una imagen de mala calidad nos lleva a niveles de confianza muy bajos y a un sistema ineficiente. Una imagen de alta calidad se logra mediante un sistema de autoenfoque y fusión (Bueno-Ibarra, 2008).

2.1.1 Sistema de adquisición de imágenes

El sistema multifoco se encarga de adquirir una pila de imágenes de diferentes campos focales de la muestra, con el objetivo de capturar toda la información localizada en el cuerpo volumétrico de la muestra para su análisis.

En la Figura 1 se muestra el funcionamiento del sistema multifoco, donde la barra azul indica el desplazamiento en Z de la platina. Inicialmente se necesitan ingresar tres parámetros, el límite inferior, límite superior del recorrido de la platina $E_z = -12{,}000\mu m$, $I_z = +120\mu m$ respectivamente y el foco tentativo de la muestra $F_z = 0\mu m$ que ayudará a agilizar el proceso. Posteriormente, para cada muestra es necesario ingresar su grosor promedio G_M y el paso de captura D_z^* en la región de captura fina que va desde $0.1\mu m \leq D_z^* \leq 1.0\mu m$. Una vez proporcionados los datos el sistema calcula las variables restantes, primeramente calcula el inicio de la muestra Ec. (18); el fin de la muestra Ec (19)

$$I_{OBJ} = \frac{G_M}{2} + F_z, \tag{18}$$

$$E_{OBJ} = I_{OBJ} - G_M, \tag{19}$$

posteriormente calcula el inicio de la región de captura fina Ec. (20), así como el fin de la región de captura fina Ec. (21)

$$I_{CF} = I_{OBJ} + R^*_{CF}, \tag{20}$$

$$E_{CF} = E_{OBJ} - R^*_{CF}, \tag{21}$$

donde $R^*_{CF} = 20\mu m$ y por último el límite de captura

$$L_z = F_z - 200. \tag{22}$$

Las regiones 1 y 2 también son campos de captura, sin embargo, la captura no es tan minuciosa como en la región de captura fina

$$N_{Región\ 1} = N_{Región\ 2} = \frac{N_z - N_{CF}}{2}, \tag{23}$$

donde

$$N_{CF} = \frac{R_{CF}}{D^*_Z}. \tag{24}$$

Las imágenes capturadas en la región de captura fina serán utilizadas en el proceso de fusión de imágenes debido a que cuentan con información del cuerpo volumétrico de la muestra, por lo que la imagen final contará con el contenido de frecuencias de los diferentes campos.

2.1.2 Autoenfoque por correlación de Pearson

La función del algoritmo de autoenfoque es la de obtener automáticamente la imagen mejor enfocada dentro de una pila de imágenes mediante el coeficiente de correlación de Pearson y a su vez ayudar a delimitar la región de mejor enfoque (región de

captura fina), BFR por sus siglas en inglés, para posteriormente aplicar el algoritmo de fusión de imágenes.

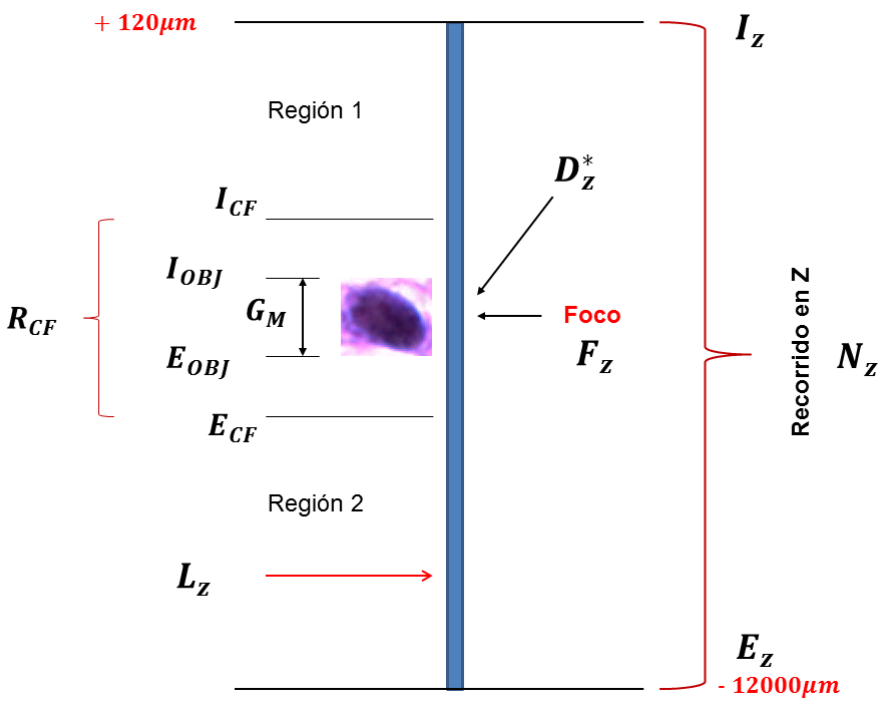


Figura 1. Sistema de adquisición de imagen multifoco.

El coeficiente de correlación de Pearson r nos indica la asociación de intensidad entre dos vectores X, Y (Zar, 1996) y puede ser obtenido mediante la siguiente expresión

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{\eta}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{\eta}\right)\left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}}, \tag{25}$$

donde η representa la cantidad de pares de datos analizados y X, Y representan el vector único de la imagen de referencia y la k-ésima imagen, obteniendo como resultado un valor de intensidad de asociación normalizado $0.0 \leq |r| \leq 1.0$.

La obtención de un valor cercano a 0 indica que no existe una correlación entre los dos vectores únicos de cada imagen; mientras que 1.0 indica una fuerte correlación entre los dos vectores únicos.

El algoritmo procesa una cantidad Q de vectores V_q en cada imagen $f(x,y)_k$ de la pila de imágenes, donde k representa la k-ésima imagen de la pila. Identifica a cada vector procesado con el subíndice $q = 1, \dots \dots, Q$. Los vectores están separados una distancia equidistante Δ con el propósito de no procesar toda la imagen, es decir, solo la información necesaria para su análisis (Ver Figura 3). La separación Δ entre cada vector V_q influye en la sensibilidad del algoritmo de autoenfoque, es decir, entre más grande sea Δ menos vectores V_q serán procesados, por lo tanto no se procesará la información suficiente para encontrar la imagen mejor enfocada. Sin embargo entre más pequeño sea Δ más vectores V_q serán procesados, teniendo así mayor información para encontrar la imagen mejor enfocada.

Los vectores V_q son calculados mediante la Ec. (26)

$$V_1 = f(1, y_0, \dots, y_M)_k,\ V_2 = f(1+\Delta, y_0, \dots, y_M)_k, \dots,$$
$$V_q = f\big((q-1)\cdot\Delta + 1, y_0, \dots, y_M\big)_k. \tag{26}$$

Con ellos se calcula el vector único FSV_k de cada imagen de la pila de imágenes

$$FSV_k = |H_1(f)|_k^2 \cup |H_2(f)|_k^2 \cup, \dots, \left|H_q(f)\right|_k^2, \tag{27}$$

donde $\left|H_q(f)\right|_k^2$ representa el espectro de potencia de los vectores V_q y $\cup$ denota la concatenación de los espectros de potencia de los vectores.

El vector FSV_1 corresponde a la última imagen adquirida en la pila de imágenes, la cual es la referencia para este sistema debido a que representa la imagen más fuera de foco, con el propósito de obtener el coeficiente de correlación de Pearson entre FSV_1 y FSV_k más cercano a 0 (Ec. (28)) (una de-correlación) para obtener la imagen mejor enfocada en la pila de imágenes.

$$f_{BF} = f_k \quad \text{donde} \quad MIN\big(N(r_k)\big), \tag{28}$$

donde r_k es el vector de valores normalizados de los coeficientes de Pearson entre FSV_1 y cada vector único de cada imagen de la pila de imágenes (FSV_k).

En la Ec. (25), $X = FSV_1$, $Y = FSV_k$ y η es el tamaño de la longitud del vector X o del vector Y.

La Figura 2 muestra el diagrama de flujo general del algoritmo de autoenfoque que utiliza el coeficiente de correlación de Pearson.

Los pasos a seguir son:

En el Paso 1 la pila de imágenes es construida con el sistema de adquisición de imágenes (microscopio automatizado). Cada imagen de la pila es procesada mediante vectores V_q separados una distancia equidistante Δ (ver Figura 3) (Paso 2); En el Paso 3 se toma una imagen de referencia adquirida intencionalmente, es la que está más fuera de foco, y se obtiene el vector único FSV_1 de esta imagen. En los pasos 4 y 5 se recorre a la siguiente imagen en la pila de imágenes y se obtiene el vector único FSV_k donde k representa la k-ésima imagen. Paso 6. Se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson entre el vector único de la imagen de referencia y el vector único de la k-ésima imagen; se obtiene la imagen con el valor de de-correlación más alto, esto nos indica la imagen mejor enfocada debido a que no tiene una correlación con la imagen más desenfocada (imagen de referencia)(Paso7). (Bueno-Ibarra, 2008).

2.1.3 Algoritmo de Fusión de imágenes

La función del algoritmo de fusión es la de formar una imagen con los mejores pixeles de cada imagen de la BFR, esto mediante la magnitud de la transformada de Fourier del canal de intensidad en el espacio de color YC_bC_r (Bueno-Ibarra, 2008).

Para la comprensión de este algoritmo es necesario entender qué son los espacios de colores. El espacio de color RGB fue creado por la comisión internacional especializada (C.I.E) con el objetivo de establecer un estándar para la luz policromática, inicialmente era conocido como cantidades X, Y y Z, pero con el paso del tiempo se definió como espacio de color Rojo (R), Verde (G) y Azul (B) (Diagrama

cromático) (Pratt, 1991). El espacio de color RGB forma el color final mediante la combinación de los tres canales, por esta razón no es adecuado para la solución de algunos problemas, por lo cual surgen nuevos espacios de colores para solucionar problemas específicos, los principales son: el modelo YUV; el modelo YIQ y el modelo YC_bC_r, los cuales utilizan el canal Y para representar la intensidad y el resto de los canales para representar el color de la imagen RGB.

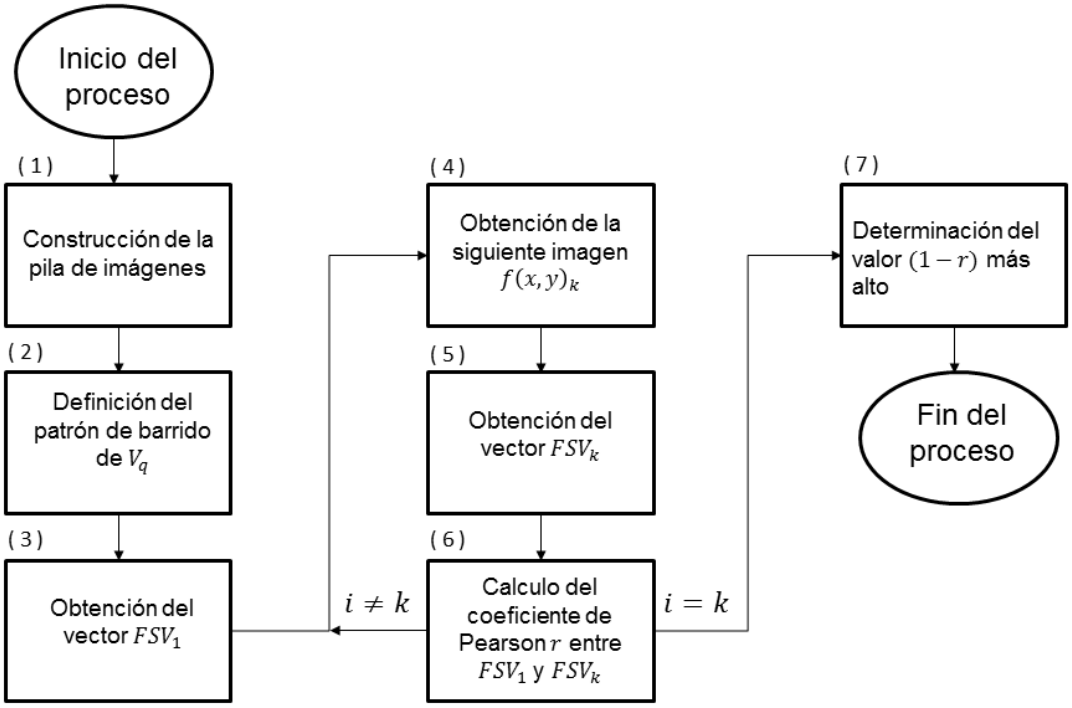


Figura 2. Diagrama de flujo general del algoritmo de autoenfoque que utiliza el coeficiente de correlación de Pearson.

En la captura de una imagen digital RGB mediante una cámara CCD, la imagen tiene valores de saturación (0 ó 255) debido a factores de ruido. Por tal motivo el modelo YC_bC_r es el adecuado para eliminar la saturación del ruido en la imagen, porque al convertir una imagen del espacio de color RGB al YC_bC_r (Ec. (29) y Ec. (30)) los valores del canal Y quedan entre 16 y 235, y entre 16 y 240 para los canales C_bC_r.

$$f^{RGB}\,(x,y) = \begin{bmatrix} 1 & -0.0009 & 1.4 \\ 1 & -0.344 & -0.714 \\ 1 & 1.772 & 0.001 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f^{Y}(x,y) \\ f^{C_b}(x,y) \\ f^{C_r}(x,y) \end{bmatrix}, \tag{29}$$

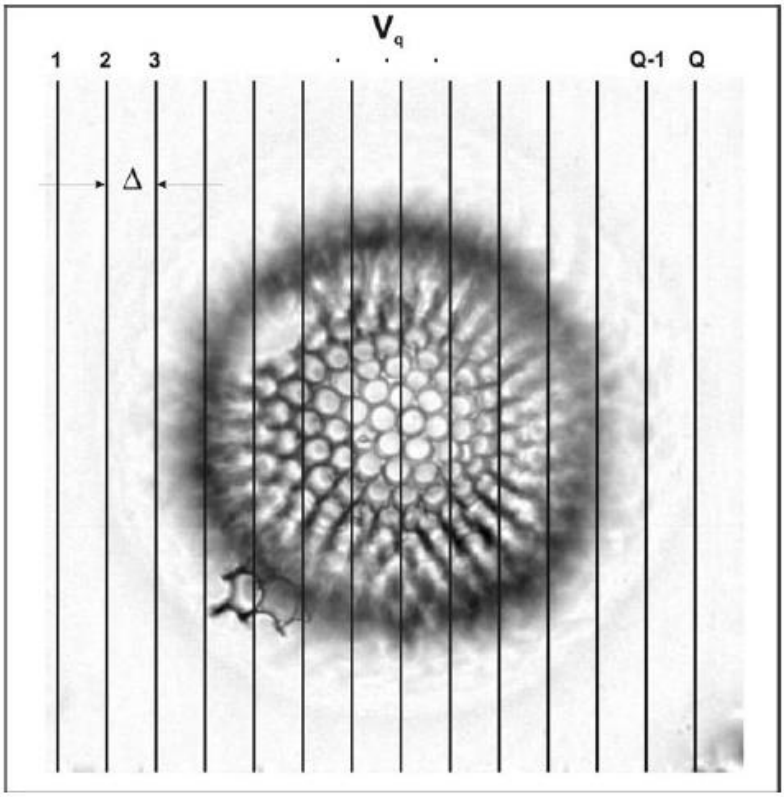


Figura 3. Patrón de procesamiento definido por los vectores V_q (Bueno-Ibarra, 2008).

$$f^{YC_bC_r}\,(x,y) = \begin{bmatrix} 0.299 & 0.587 & 0.144 \\ -0.169 & -0.331 & 0.5 \\ 0.5 & -0.419 & -0.081 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f^{R}(x,y) \\ f^{G}(x,y) \\ f^{B}(x,y) \end{bmatrix}, \tag{30}$$

donde $f^{RGB}\,(x,y)$ representa la imagen digital en el espacio de color RGB, $f^{YC_bC_r}\,(x,y)$ representa la imagen digital en el espacio de color YC_bC_r con sus canales $f^{R}(x,y)$, $f^{G}(x,y)$, $f^{B}(x,y)$ y $f^{Y}(x,y)$, $f^{C_b}(x,y)$, $f^{C_r}(x,y)$ respectivamente. Así para convertir de RGB a YC_bC_r (Ec. (30)) se define la función $\Phi^{YC_bC_r}\{f^{RGB}(x,y)\}$ y para convertir de YC_bC_r a RGB (Ec. (29)) se define la función $\Phi^{RGB}\{f^{YC_bC_r}(x,y)\}$ expresadas en forma notacional por

$$f^{YC_bC_r}(x,y) = \Phi^{YC_bC_r}\{\, f^{RGB}(x,y)\,\}, \tag{31}$$

$$f^{RGB}(x,y) = \Phi^{RGB}\{\, f^{YC_bC_r}(x,y)\,\}. \tag{32}$$

Una vez comprendido y definidas las funciones para las conversiones entre espacios de color, seguimos con el funcionamiento del algoritmo de fusión de imágenes.

Primeramente se obtiene la representación de la imagen mejor enfocada $f_{BF}(x,y)$ en el espacio de color YC_bC_r mediante la Ec (31), obteniendo $f_{BF}^{YC_bC_r}(x,y)$ donde $f_{BF}^{Y}(x,y)$, $f_{BF}^{C_b}(x,y)$ y $f_{BF}^{C_r}(x,y)$ son los canales de YC_bC_r.

Posteriormente, se obtiene la representación en el espacio de color YC_bC_r para cada imagen de la BFR de la pila de imágenes (Ec. (33)), así como sus canales $f^{Y}(x,y)_k$, $f^{C_b}(x,y)_k$ y $f^{C_r}(x,y)_k$ respectivamente

$$f^{YC_bC_r}(x,y)_k = \Phi^{YC_bC_r}\{f(x,y)_k\} \;\; para\; k = 1,2\ldots,K. \tag{33}$$

Como el objetivo del algoritmo es fusionar los mejores canales de intensidad $f^{Y}(x,y)_k$ de cada imagen de la BFR de la pila de imágenes, se obtiene el valor mayor de la magnitud del coeficiente de Fourier de cada pixel de las imágenes de la BFR mediante la Ec. (34)

$$f^{Y^*}(x,y) = \begin{cases} f^{Y}(x,y)_k & sí\ |\,\mathfrak{F}\{\, f^{Y}(x,y)_k\,\}\,| \geq |\,\mathfrak{F}\{\, f^{Y}(x,y)_{k+1}\,\}\,| \\ f^{Y}(x,y)_{k+1} & para\ cualquier\ otro\ caso \end{cases}, \tag{34}$$

para $x = 1,2,\ldots,N$, $y = 1,2,\ldots,M$ y $k = 1,2,\ldots,K-1$, donde $f^{Y^*}(x,y)$ representa el canal de intensidad final fusionado con los mejores pixeles de la BFR. Finalmente obtenemos la imagen fusionada mediante la unión de los canales de color de la imagen mejor enfocada $f_{BF}^{C_b}(x,y)$ y $f_{BF}^{C_r}(x,y)$, y la unión del canal de intensidad fusionado $f^{Y^*}(x,y)$(Ec. (35))

$$f^{Y^*C_bC_r}(x,y) = \left\{f^{Y^*}(x,y) \cup f_{BF}^{C_b}(x,y) \cup f_{BF}^{C_r}(x,y)\right\}, \tag{35}$$

donde $f^{Y^*C_bC_r}(x,y)$ representa la imagen final fusionada en el espacio de color YC_bC_r

$$f^{RGB^*}(x,y) = \Phi^{RGB}\{f^{Y^*C_bC_r}(x,y)\}, \tag{36}$$

y $f^{RGB^*}(x,y)$ representa la imagen final fusionada en el espacio de color RGB, el cual tiene los detalles más relevantes para el análisis de la imagen (detalles finos, bordes).

En la Figura 4 se muestra el diagrama de flujo para obtener la imagen final fusionada. Los pasos a seguir son:

En el Paso 1, la imagen mejor enfocada es convertida al espacio YC_bC_r, $f_{BF}^{YC_bC_r}(x,y)$. Se obtienen los canales Y, C_b, C_r de la imagen mejor enfocada, donde el canal Y representa el canal de intensidad y los canales C_b, C_r representan los canales de color (Paso 2). Del Paso 3 al 5 se obtiene la transformada de Fourier del canal de intensidad para la imagen mejor enfocada $f_{BF}^{Y}(x,y)$ y la k-ésima imagen $f^{Y}(x,y)_k$; En el Paso 6 se analizan y se selecciona el valor más alto del coeficiente de Fourier de cada pixel entre la imagen mejor enfocada y la imagen k-ésima para formar la imagen con los mejores pixeles de las dos imágenes (fusión de dos imágenes); La imagen fusionada pasa a ser la imagen mejor enfocada y se repiten los pasos 5 y 6 (Paso 7). Del Paso 8 al 9 se obtiene la imagen en el espacio de color Y, C_b, C_r para posteriormente pasarla al espacio de color RGB, obteniendo así la imagen final con las mejores características para su análisis (Bueno-Ibarra, 2008).

2.2 Algoritmo para calcular densidades espectrales binarias e índices de firmas espectrales del VSMB

La densidad espectral binaria de una función es equivalente a la huella dactilar de una persona, con la que podemos calcular su índice de firma espectral i^{SS} y así poder delimitar un intervalo de confianza de índices de firma espectral para la identificación de un objeto, en nuestro caso identificar el VSMB. Un objetivo particular de este trabajo de investigación es desarrollar nuevas densidades espectrales binarias, para poder observar si los nuevos resultados con las nuevas densidades espectrales

binarias ayudan a obtener un intervalo de confianza de índices de firma espectral más estrecho.

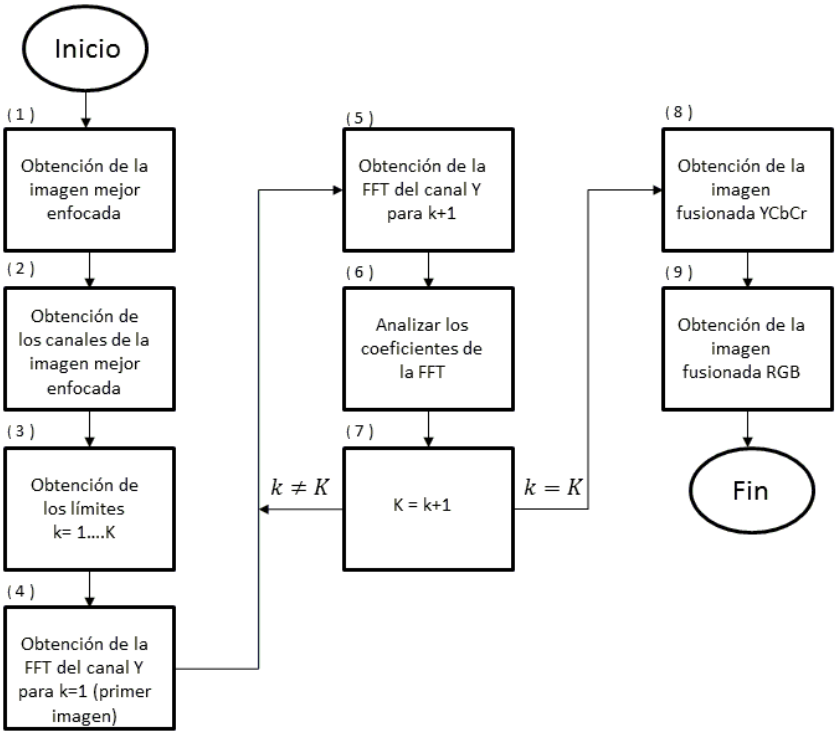


Figura 4. **Diagrama de flujo de algoritmo de fusión.**

La metodología utilizada para la obtención de i^{SS} es explicada a continuación (Figura 5):

Sea $f_w^{\lambda}(x,y)$ la matriz de la wth imagen obtenida del banco de filtros a color de los cuerpos de inclusión del VSMB (Paso 1); $I^{\lambda_R}(x,y)$, $I^{\lambda_G}(x,y)$, $I^{\lambda_B}(x,y)$ y sus respectivos canales en el espacio de color RGB (Paso 2).

Mediante un estudio de perfil de intensidad, se obtiene que el canal verde proporciona mayor información que los canales rojo y azul, por lo tanto se utiliza la función $I^{\lambda_G}(x,y)$ para el análisis. Como la función $I^{\lambda_G}(x,y)$ contiene información del cuerpo de inclusión y ruido, llámese ruido a toda información que no corresponda al cuerpo de inclusión, es necesario segmentar la función para analizar solo la información del cuerpo de inclusión (ver Figura 6).

Esto se logra delimitando el cuerpo de inclusión mediante una función “Contour”, la cual obtiene el contorno del cuerpo de inclusión por medio de los cambios bruscos de intensidad, obteniéndose así la función $I_{Contour}^{\lambda_G}(x,y)$ (Paso 3). Posteriormente se binariza la función $I_{Contour}^{\lambda_G}(x,y)$ de tal manera que todo lo que se encuentra dentro del área del contorno sea 1 y lo demás 0 (Ec. (37))

$$I_{VSMB-seg}^{\lambda_G}(x,y) = \begin{cases} 1 & \{\forall(x,y)|I_{Contour}^{\lambda_G}(x,y) \in \acute{a}rea\ del\ contorno\} \\ 0 & Cualquier\ otra\ cosa \end{cases}, \quad (37)$$

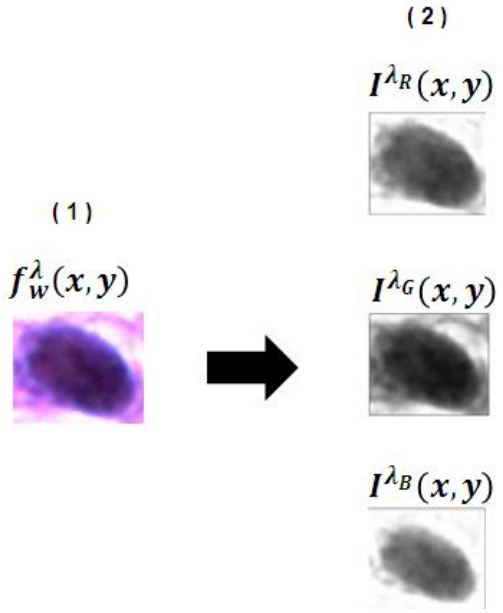


Figura 5. Imagen dividida en sus respectivos canales RGB.

y se calcula el centroide (x_c, y_c) del cuerpo de inclusión del VSMB (Ec. (38) y Ec. (39)) (Paso 4)

$$x_c = \frac{\sum_{i=1}^{P}\sum_{j=1}^{N}(i) * I_{VSMB-seg}^{\lambda_G}(i,j)}{\sum_{i=1}^{P}\sum_{j=1}^{N} I_{VSMB-seg}^{\lambda_G}(i,j)}, \quad (38)$$

$$y_c = \frac{\sum_{i=1}^{P}\sum_{j=1}^{N}(j) * I_{VSMB-seg}^{\lambda_G}(i,j)}{\sum_{i=1}^{P}\sum_{j=1}^{N} I_{VSMB-seg}^{\lambda_G}(i,j)}, \quad (39)$$

posteriormente se calcula el radio mínimo R_{Min} del cuerpo de inclusión a partir del centroide (x_c, y_c) y rotándolo 360° se obtiene la función círculo, $Circ(R_{Min})$, utilizada para construir la función máscara $I_{Mask}^{\lambda_G}(x,y)$(Paso 5 al 7).

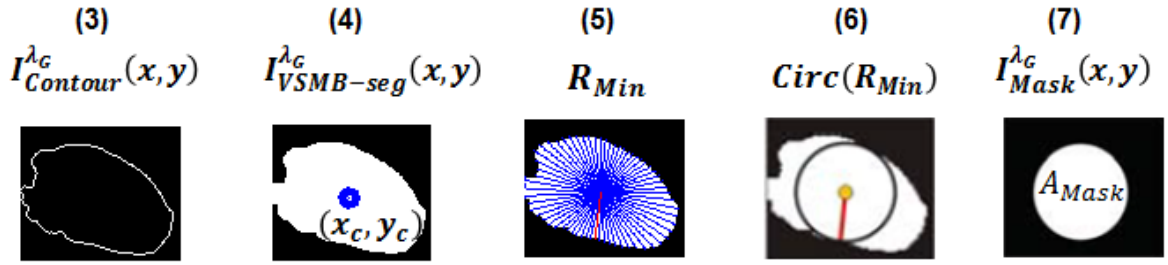


Figura 6. Proceso de segmentación.

Finalmente, para obtener el índice de firma espectral se analizan las funciones mediante los pasos 8 al paso 11 de la Figura 7. Se multiplica punto por punto la función máscara $I_{Mask}^{\lambda_G}(x,y)$ con la función del canal verde del cuerpo de inclusión $I^{\lambda_G}(x,y)$ dando como resultado la nueva función del cuerpo de inclusión $I_{IB}^{\lambda_G}(x,y)$(Paso 8). En el paso 9, se aplica el filtro no lineal a la función $I_{IB}^{\lambda_G}(x,y)$ dando como resultado la función en el dominio de frecuencias $f_w^{\lambda_G}(u,v)_k$.

Ahora, para obtener la función de densidad espectral binarizada se aplica la siguiente condición:

$$SSF\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) = \begin{cases} 1, & si\ Re\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) > 0 \\ 0, & cualquier\ otra\ cosa \end{cases}, \tag{40}$$

en el paso 10.

$$i^{SS} = \left\{ \frac{SSF\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right)}{(A_{Mask})_w} \middle| (u,v) \in \mathbb{C} \right\}. \tag{41}$$

En el paso 11, se calcula el índice de firma espectral mediante la Ec. (41) para cada imagen $f_w^{\lambda}(u,v)$ del banco de filtros, donde A_{Mask} ese obtiene mediante:

$$A_{Mask} = \sum_{x,y} I_{Mask}^{\lambda_G}(x,y), \;\; for\; I_{Mask}^{\lambda_G}(x,y) > 0. \tag{42}$$

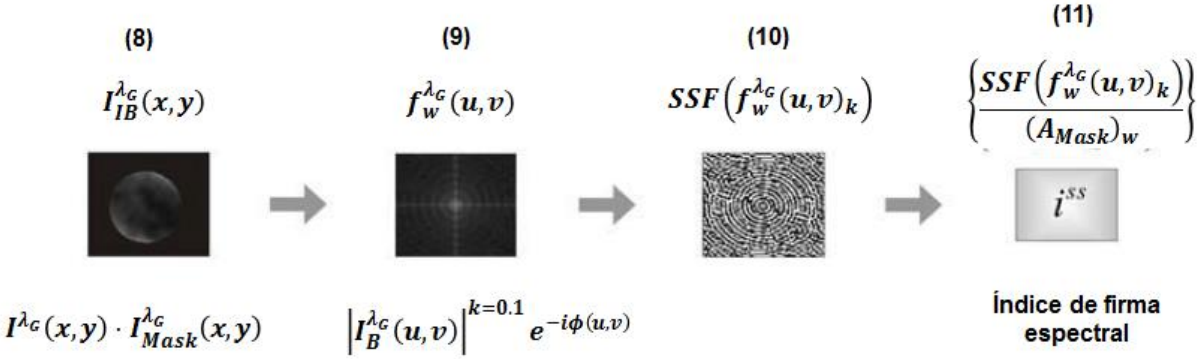


Figura 7. Obtención del índice de firma espectral.

Para ubicar a lector visualmente, se muestran imágenes de densidades espectrales binarias de diferentes cuerpos de inclusión del VSMB, así como de manchas que no representan al VSMB y una comparación entre ellas, basada en esta metodología. En la Figura 8 se muestra como se ven algunas morfologías de los cuerpos de inclusión del VSMB y sus densidades espectrales binarias.

Existen manchas en el tejido del camarón que pueden ser confundidas con cuerpos de inclusión del VSMB, pero su densidad espectral binaria (contenido de frecuencias espectrales) es diferente a los de los cuerpos de inclusión del VSMB (Figura 9).

Las nuevas propuestas para la creación de densidades espectrales binarias surgen en la forma de analizar los datos en el dominio de frecuencias al aplicar el filtro no lineal. En la metodología existente se utiliza la Ec. (40) para analizar el contenido de frecuencias de las funciones $f_w^{\lambda_G}(u,v)_k$, sin embargo solo se analiza la parte real de la función. ¿Qué sucede con la parte imaginaria de la función $f_w^{\lambda_G}(u,v)_k$?, ¿Qué sucede si invertimos la condición de la Ec. (40)?.

En la Figura 10 se muestra una comparación amplificada entre un cuerpo de inclusión del VSMB y una mancha en el tejido del camarón, así como de sus densidades espectrales binarias.

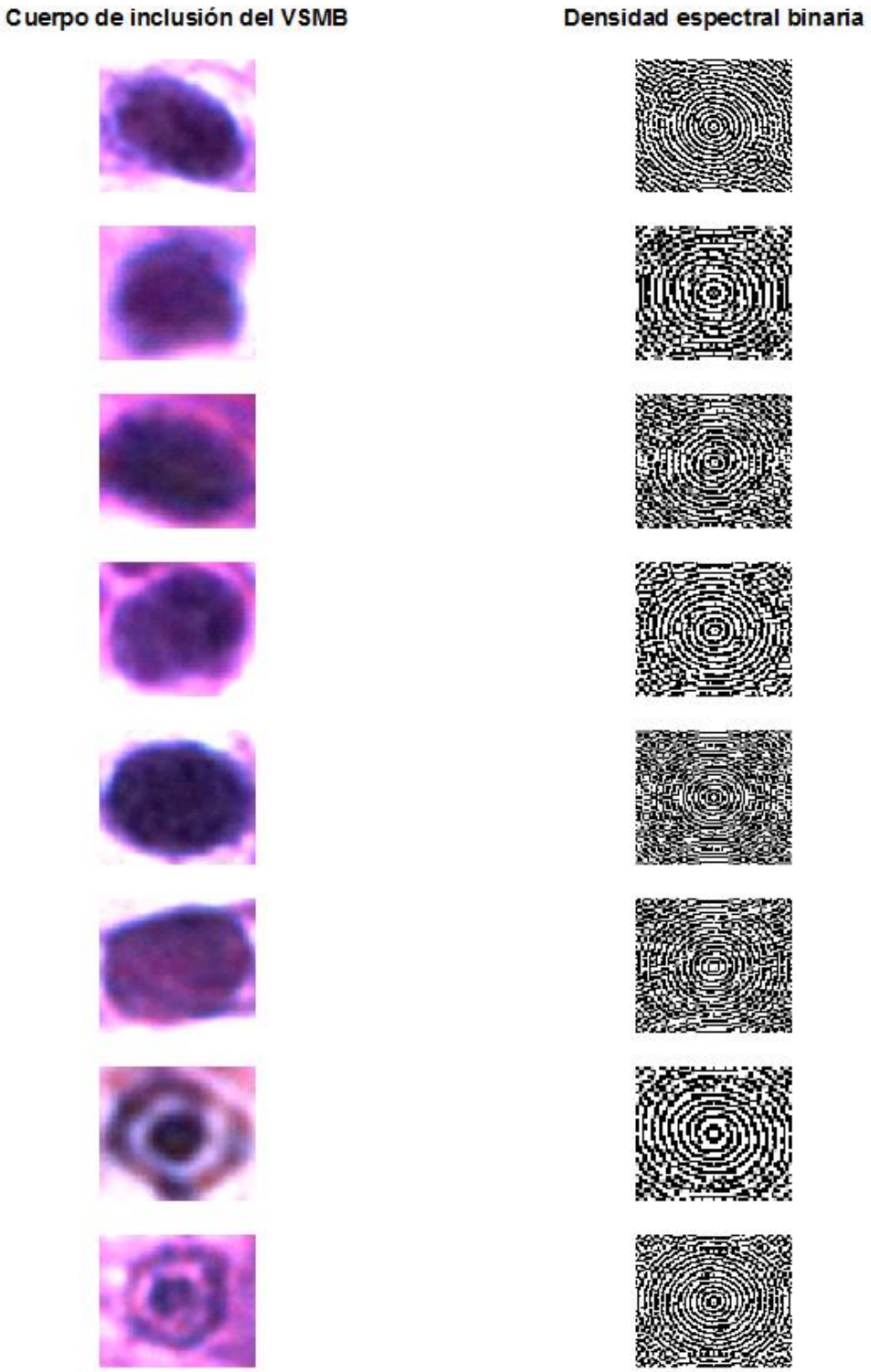


Figura 8. Cuerpos de inclusión del VSMB y sus densidades espectrales binarias.

Manchas en tejido de camarón **Densidad espectral binaria**

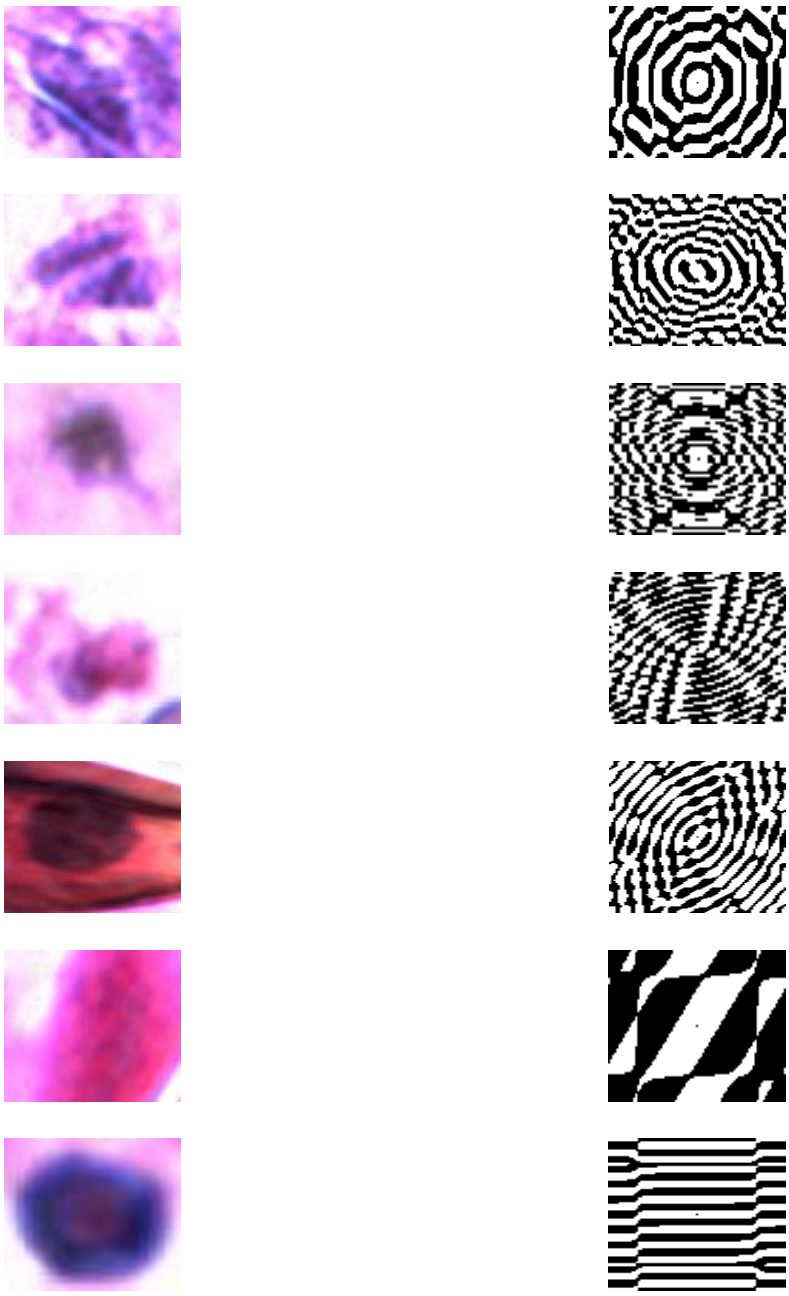


Figura 9. Manchas en tejido de camarón sin VSMB y sus densidades espectrales binarias.

Si

$$SSF\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) = \begin{cases} 1, & si\ Re\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) < 0 \\ 0, & cualquier\ otra\ cosa \end{cases}, \tag{43}$$

$$SSF\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) = \begin{cases} 1, & si\ Im\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) > 0 \\ 0, & cualquier\ otra\ cosa \end{cases}, \tag{44}$$

$$SSF\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) = \begin{cases} 1, & si\ Im\left(f_w^{\lambda_G}(u,v)_k\right) < 0 \\ 0, & cualquier\ otra\ cosa \end{cases}. \tag{45}$$

entonces, modificando la Ec. (40), se desarrollan tres nuevas densidades espectrales binarias. La primera densidad espectral binaria propuesta se expresa en la Ec. (43), donde se invierte la condición para el análisis del contenido en frecuencias de la función $f_w^{\lambda_G}(u,v)_k$. La segunda densidad espectral binaria propuesta se expresa en la Ec. (44), donde se analiza la parte imaginaria del contenido de frecuencias de la función $f_w^{\lambda_G}(u,v)_k$. La tercera densidad espectral binaria propuesta se expresa en la Ec. (45), donde se invierte la condición para el análisis del contenido en frecuencias de la Ec. (44).

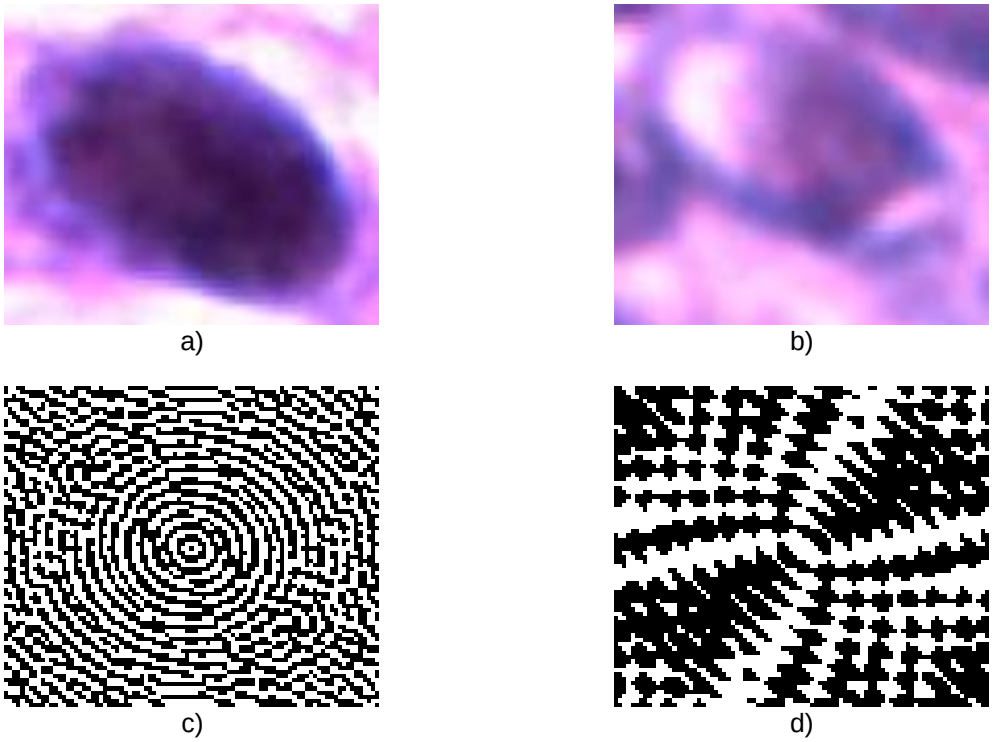


Figura 10. Comparación de muestra infectada y no infectada con el VSMB. a) Cuerpo de inclusión del VSMB, b) Mancha sin VSMB, c) Densidad espectral del cuerpo de inclusión del VSMB y d) Densidad espectral de la mancha sin VSMB.

2.3 Algoritmo para la detección del VSMB en tejido de camarón mediante correlación no lineal

A continuación se muestra el proceso llevado a cabo para la identificación del VSMB en tejidos de camarón; esto a través de la correlación de un filtro no lineal usando la transformada de Fourier. Los pasos a seguir son:

En la Figura 11 se muestra el primer bloque del proceso para identificar VSMB en tejido de camarón. Sea $F_1^{\lambda}, F_2^{\lambda}, F_3^{\lambda}, \dots, F_W^{\lambda}$ el conjunto de imágenes, en donde se quiere identificar la presencia del VSMB, adquiridas mediante el sistema de adquisición de imágenes (Paso1) y $F_i^{\lambda}(x,y)$ es la función de la i^{th} imagen capturada en el espacio de color RGB, donde $I_i^{\lambda R}(x,y)$, $I_i^{\lambda G}(x,y)$, $I_i^{\lambda B}(x,y)$ son las matrices de intensidad de sus respectivos canales (Paso 2). Mediante un estudio de perfil de intensidad, el canal verde es el que proporciona mayor información para el análisis de las imágenes, por lo que se trabaja con la función de intensidad $I_i^{\lambda G}(x,y)$.

Sea $I_{mask}^{\lambda G}(x,y)_i \in [0,1]$, la máscara binaria utilizada para segmentar la imagen $I_i^{\lambda G}(x,y)$, calculada por

$$I_{mask}^{\lambda G}(x,y)_i = \left\{ I_i^{\lambda G}(x,y) < \tau | \tau \in \mathbb{Z}^{+} \wedge 0 \leq \tau \leq 255 \right\}, \tag{46}$$

donde τ es un valor umbral y al ir cambiando su valor poder mejorar las características de los cuerpos de inclusión y obtener mejores resultados en la identificación del VSMB. Así, $Ie_i^{\lambda G}(x,y)$ se obtiene mediante

$$Ie_i^{\lambda G}(x,y) = I_i^{\lambda G}(x,y) \cdot I_{mask}^{\lambda G}(x,y)_i, \tag{47}$$

donde $\cdot$ representa una multiplicación punto a punto (Paso3). Paso 4. Esta función es dividida en un mosaico de imágenes $T_{j,l}^{\lambda_G}(x,y)$ (en subimágenes), para tener una mejor distinción en los picos de correlación.

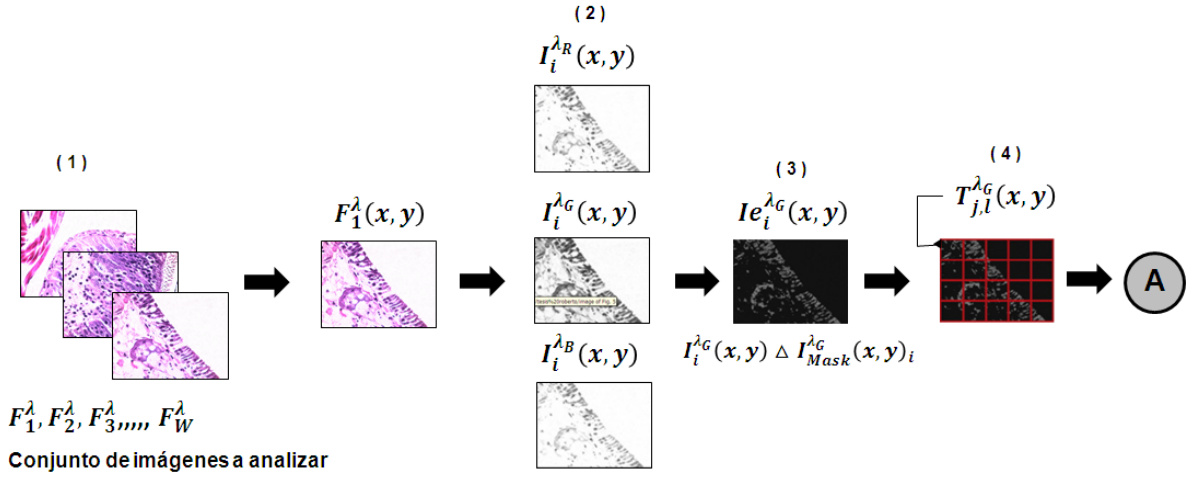


Figura 11. Primera parte del diagrama de bloques del VSMB.

En la Figura 12 se muestra el segundo bloque del proceso para identificar VSMB en tejido de camarón. Paso 5. Cada mosaico $T_{j,i}^{\lambda G}(x,y)$ es extraído para ser analizado. Se aplica el filtro no lineal (Ec. (17)) sobre $T_{j,i}^{\lambda G}(x,y)$ con k=0.1, para incrementar la capacidad de discriminación y así obtener $t_{j,i}^{\lambda G}(x,y)$, la función de intensidad en el plano complejo que va a ser correlacionada (Paso 6). Posteriormente se toma una función del banco de filtros de cuerpos de inclusión del VSMB $g_1^{\lambda}, g_2^{\lambda}, g_3^{\lambda}, \dots, g_p^{\lambda}$ la cual es separada en sus respectivos canales RGB donde $g_q^{\lambda G}(x',y')$ proporciona mayor información para su análisis, se le aplica el filtro no lineal (Ec. (17)) obteniendo la amplitud compleja $g_{q1}^{*\lambda G}(u',v')$ (Paso 7). Las funciones obtenidas en los pasos 6 y 7 son correlacionadas $t_{j.i}^{\lambda G}(x,y) * g_q^{*\lambda G}(u',v')$, lo cual permite obtener la identificación de posibles cuerpos de inclusión, dependiendo de los valores de los picos de energía de la correlación. Se obtiene el módulo al cuadrado del plano de correlación (Paso 8) para diferenciar de mejor manera los picos de correlación (Paso 9).

En la Figura 13 se muestra el tercer bloque del proceso para identificar VSMB en tejido de camarón. Paso 10. Se compara con un umbral de correlación delimitado a criterio mediante una serie de correlaciones; Paso 11 y 12. Las coordenadas del pico máximo de correlación son identificadas y entra al segundo proceso (2.2 Algoritmo para calcular densidades espectrales binarias e índices de firmas espectrales del

VSMB) comparando el índice espectral con el intervalo de confianza de índices espectrales que nos indican la identificación positiva del VSMB.

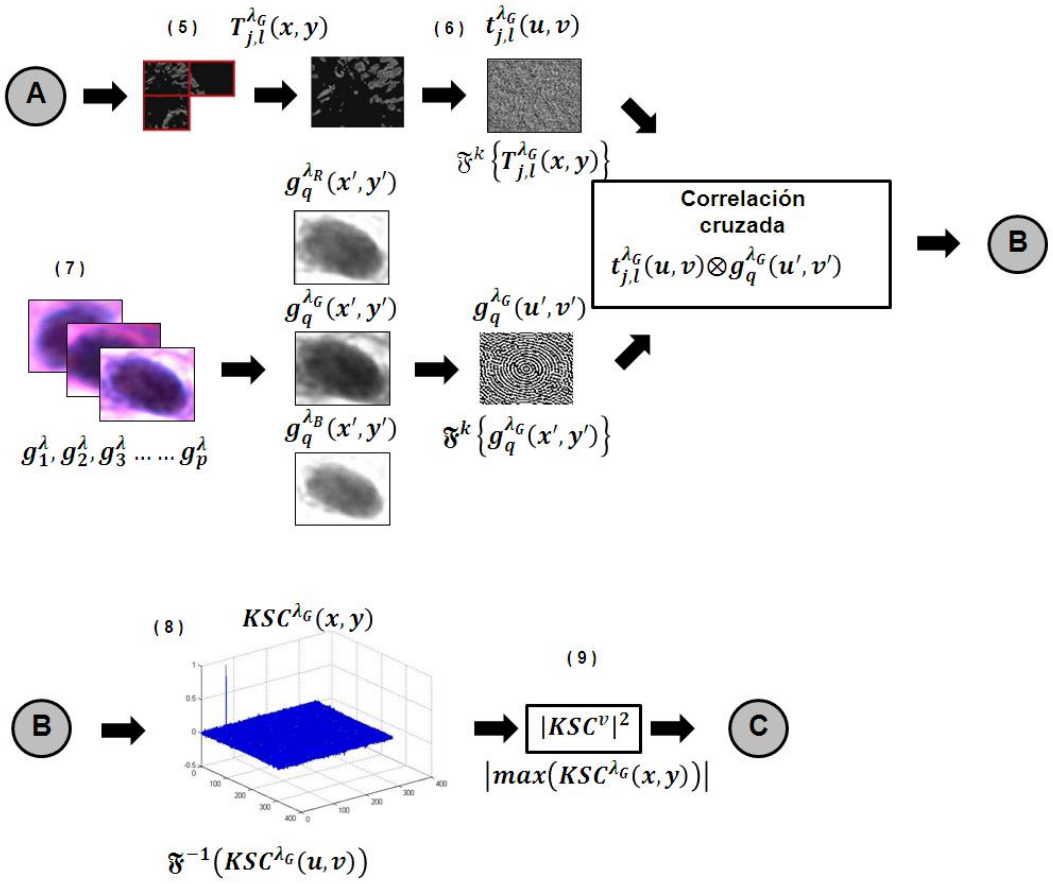


Figura 12. Segunda parte del diagrama de bloques del VSMB.

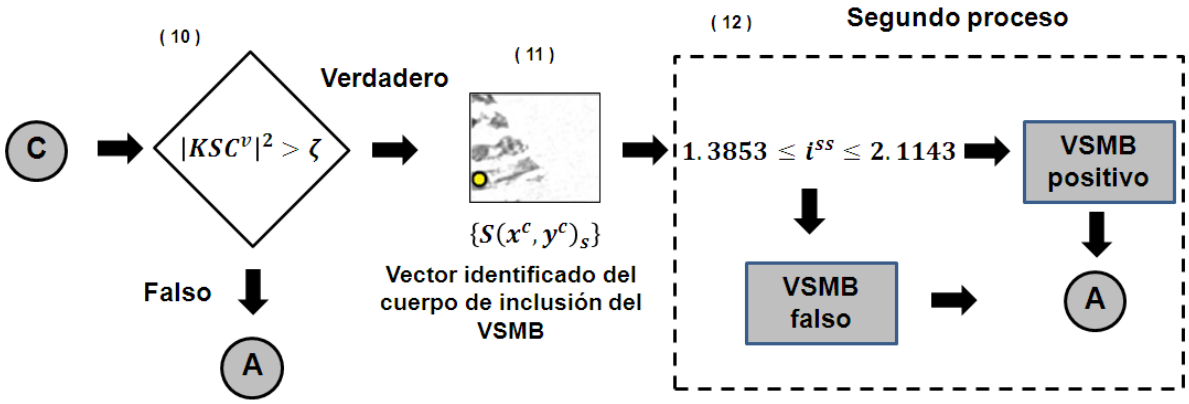


Figura 13. Tercera parte del diagrama de bloques de VSMB.

El intervalo de confianza de índices espectrales de este algoritmo se encuentra entre $1.3853 \leq i^{ss} \leq 2.1143 \pm$ con un nivel de confianza de 95.4%. La efectividad de este algoritmo para identificar el VSMB en tejido de camarón se muestra en la Figura 14 y en la Figura 15.

2.3.1 Correlación no lineal y correlación no lineal adaptativa

La correlación no lineal entre dos funciones se calcula mediante la Ec. (48)

$$C_{NL}(IP, IO) = \mathfrak{F}^{-1}\left(|\mathfrak{F}(IP)|^{k} e^{i\phi IP} \cdot |\mathfrak{F}(IO)|^{k} e^{i\phi IO}\right), \tag{48}$$

donde IP representa la imagen problema donde queremos identificar el VSMB, IO representa la imagen objetivo que queremos identificar, $\mathfrak{F}^{-1}$ representa la transformada inversa de Fourier, $|\mathfrak{F}(IP)|$ y $|\mathfrak{F}(IO)|$ representan a los módulos de la transformada de Fourier de la imagen problema y la imagen objetivo, respectivamente, k representa el factor de no linealidad, para este caso toma el valor de 0.1, ϕIP y ϕIO representa la fase de la transformada de Fourier de la imagen problema y la imagen objetivo, respectivamente.

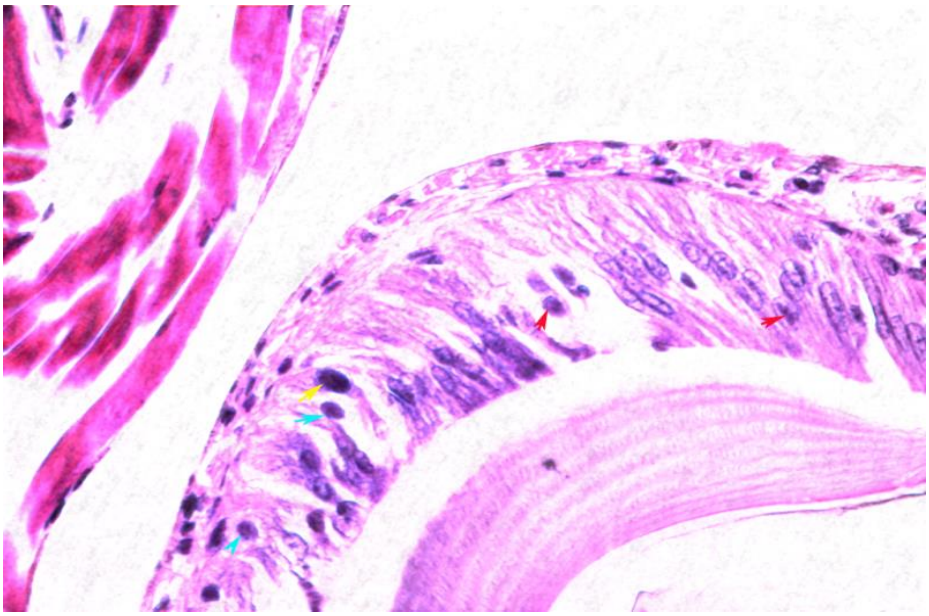


Figura 14. Tejido epitelio cuticular.

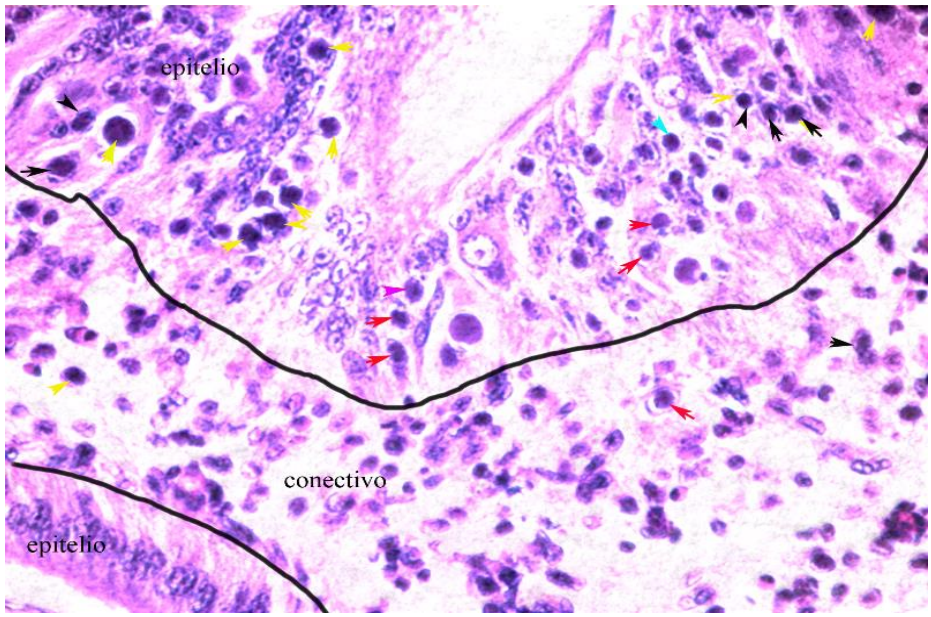


Figura 15. Tejido epitelio y conectivo.

Para que la correlación no lineal sea adaptativa se le agrega un factor Rz a la Ec. (48), el cual tomará valores de $0 \leq Rz \leq 1$, que multiplica al factor de no linealidad k (Solís, 2012)

$$C_{NLA}(IP, IO) = \mathfrak{F}^{-1}\left(|\mathfrak{F}(IP)|^{Rz \cdot k} e^{i\phi IP} \cdot |\mathfrak{F}(IO)|^{k} e^{i\phi IO}\right), \tag{49}$$

donde Rz es calculado mediante la Ec. (50)

$$\begin{gathered} Si\ Promedio(IP) > Promedio(IO) \\ Entonces, Rz = \frac{Promedio(IO)}{Promedio(IP)}\ si\ no, \qquad Rz = \frac{Promedio(IP)}{Promedio(IO)}, \end{gathered} \tag{50}$$

por lo tanto Rz siempre será menor a uno y cuando la imagen problema es la misma que la imagen objetivo, Rz será igual o muy próximo a uno por lo que no modificará el factor de no linealidad k.

Capítulo 3. Resultados

En este capítulo se expondrán los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación y los resultados obtenidos con las nuevas densidades espectrales binarias desarrolladas.

3.1 Autoenfoque de imágenes

Identificar la imagen mejor enfocada de una pila de imágenes (Figura 16) ayudará a obtener las mejores características del objeto a analizar. Se utilizó una pila de 60 imágenes de trichodinas, debido a los detalles finos que presenta en comparación a un cuerpo de inclusión del VSMB, para ver los resultados del algoritmo.

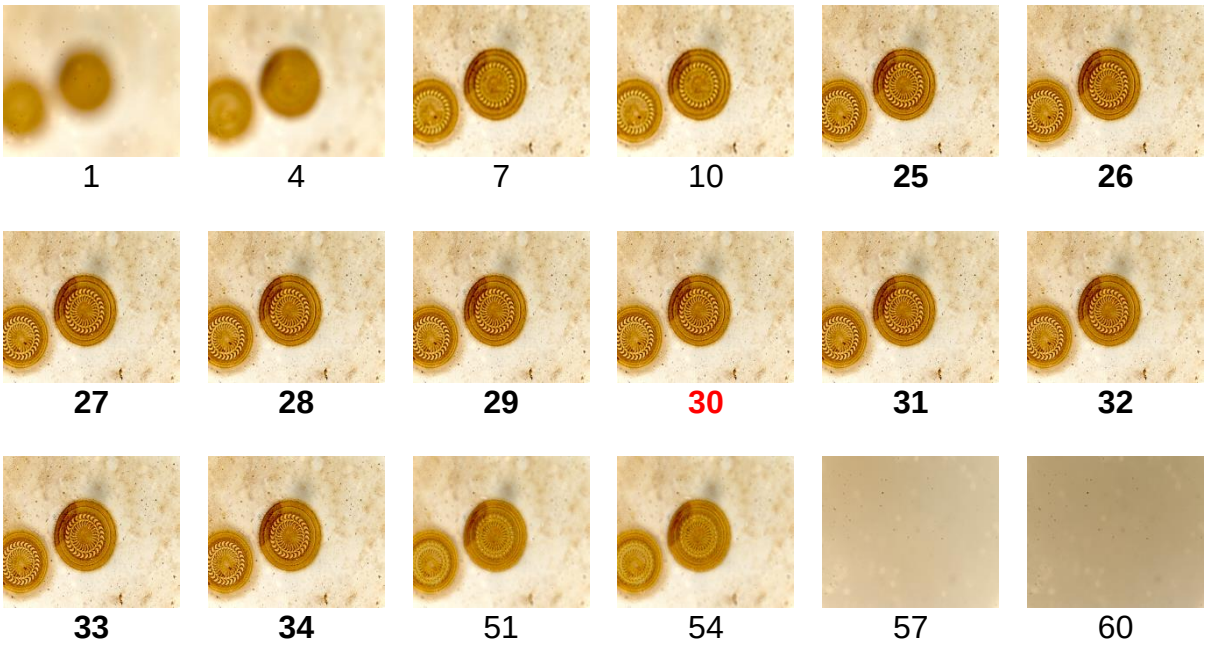


Figura 16. Muestras de la pila de imágenes.

En la Figura 16 la imagen mejor enfocada es la número 30, una parte de la BFR se encuentra de la imagen 25 a la imagen 34 que será utilizada en el método de fusión de imágenes y la imagen 60 es la imagen de referencia totalmente fuera de foco.

Figura 17. Imagen mejor enfocada.

3.2 Fusión de imágenes

Al fusionar imágenes, se busca obtener una imagen con más información que la imagen mejor enfocada para poder realizar un análisis más preciso. A partir de la imagen mejor enfocada (Figura 17) se fusionan las imágenes de la BFR para obtener la imagen final fusionada (Figura 18), obteniendo la información que no se encuentra en la imagen mejor enfocada, para así tener la información de los diferentes planos del objeto para su análisis.

3.3 Densidad espectral binaria e índice espectral

3.3.1 Primer propuesta

Aplicando la metodología para calcular densidades espectrales binarias e índices de firma espectral del VSMB y analizando el contenido de frecuencias mediante la Ec. (43) se obtienen los resultados mostrados en la Figura 19.

Figura 18. Imagen final fusionada.

Esta metodología es aplicada a los 169 cuerpos de inclusión más relevantes y una vez obtenidas las densidades espectrales binarias se calculan los índices de firma espectral mediante la Ec. (41) obteniendo como resultado un rango de índice de firma espectral $1.3814 \leq i^{ss} \leq 2.1234$.

3.3.2 Segunda propuesta

Aplicando la metodología para calcular densidades espectrales binarias e índices de firma espectral del VSMB y analizando el contenido de frecuencias mediante la Ec. (44) se obtienen los resultados mostrados en la Figura 20.

Esta metodología es aplicada a los 169 cuerpos de inclusión más relevantes y una vez obtenidas las densidades espectrales binarias se calculan los índices de firma

espectral mediante la Ec. (41) obteniendo como resultado un rango de índice de firma espectral $1.3814 \leq i^{ss} \leq 2.1206$.

Cuerpo de inclusión del VSMB **Densidad espectral binaria**

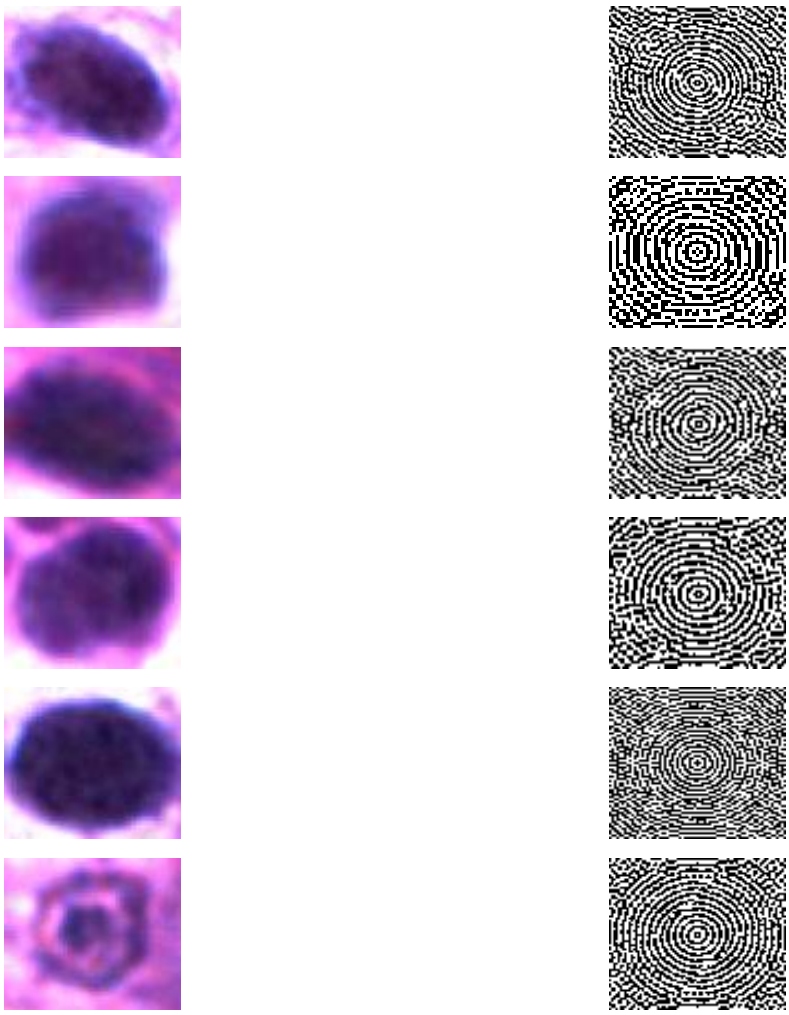


Figura 19. Resultados primer propuesta.

3.3.3 Tercer propuesta

Aplicando la metodología para calcular densidades espectrales binarias e índices de firma espectral del VSMB y analizando el contenido de frecuencias mediante la Ec. (45) se obtienen los resultados mostrados en la Figura 21.

Esta metodología es aplicada a los 169 cuerpos de inclusión más relevantes y una vez obtenidas las densidades espectrales binarias se calculan los índices de firma

espectral mediante la Ec. (41) obteniendo como resultado un rango de índice de firma espectral $1.3805 \leq i^{ss} \leq 2.1195$.

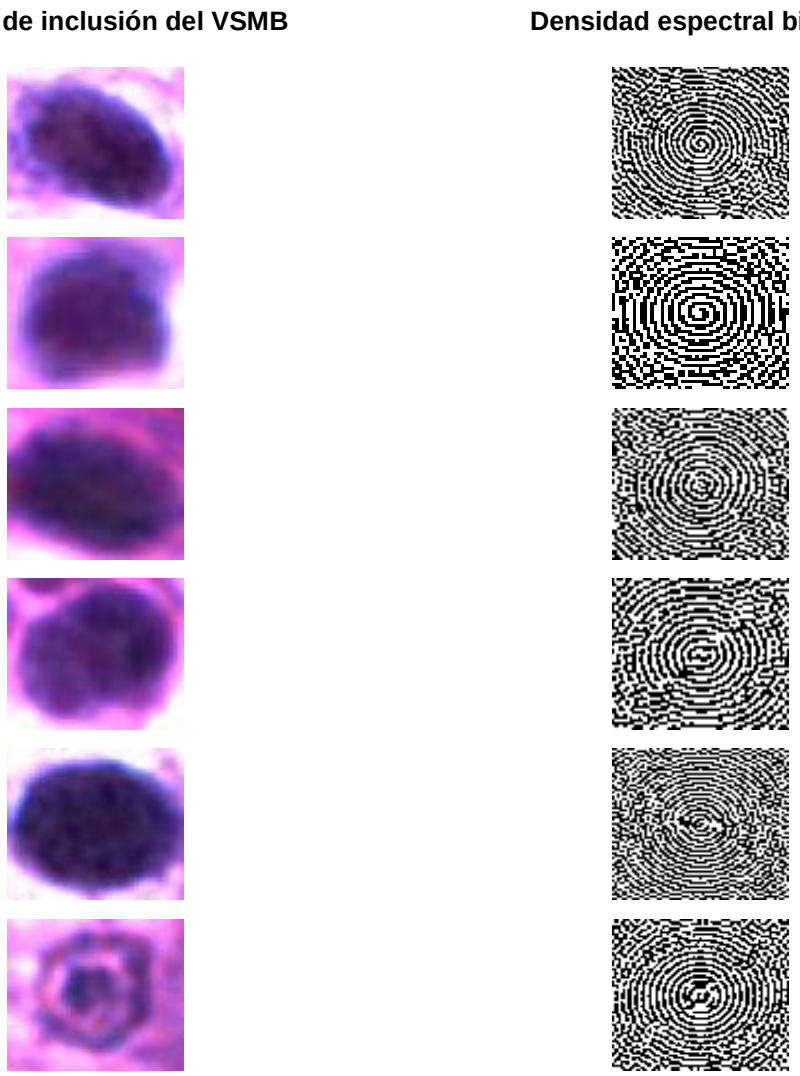


Figura 20. Resultados segunda propuesta.

3.4 Correlación no lineal adaptativa

Esta metodología no es aplicable para identificar el VSMB mediante imágenes con cuerpos de inclusión de VSMB ya que no mejora el proceso. Debido a esto, se trabajó con el método de correlación no lineal, obteniendo picos de correlación bien definidos (Figura 24). La Figura 22 muestra un cuerpo de inclusión del VSMB cuya presencia se busca identificar en la Figura 23.

Dando como resultado la identificación y la ubicación del cuerpo de inclusión en la subimagen de la imagen a analizar (Figura 24).

Cuerpo de inclusión del VSMB **Densidad espectral binaria**

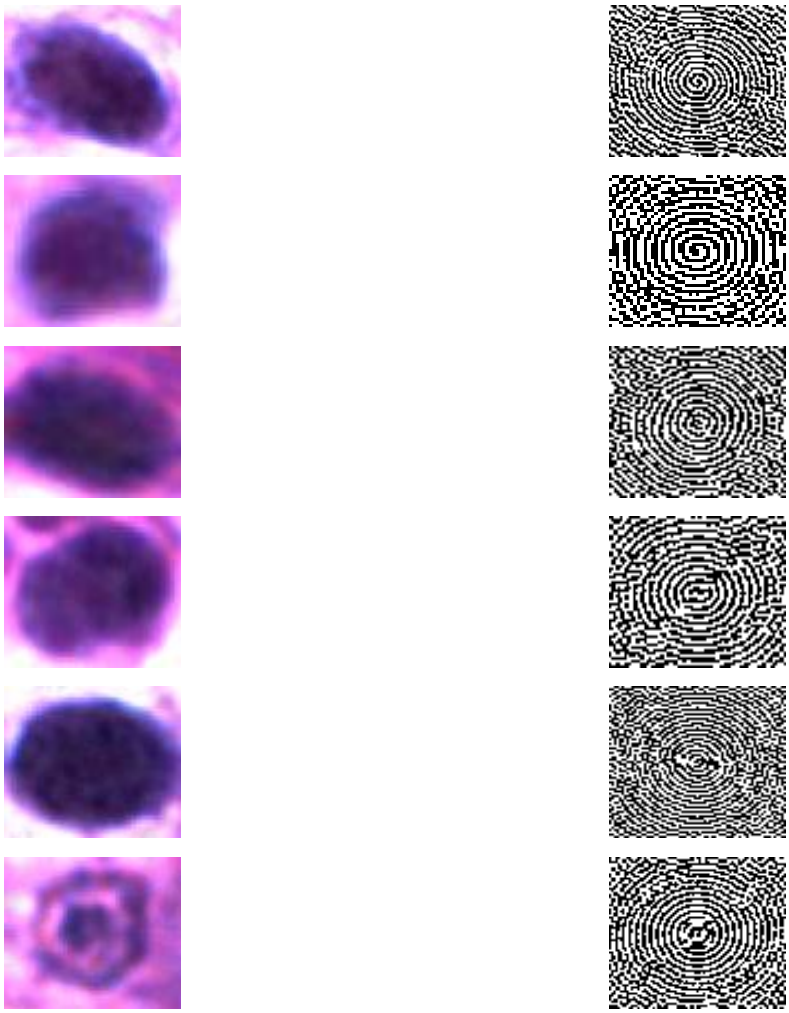


Figura 21. Resultados tercer propuesta.

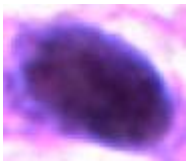


Figura 22. Cuerpo de inclusión de VSMB.

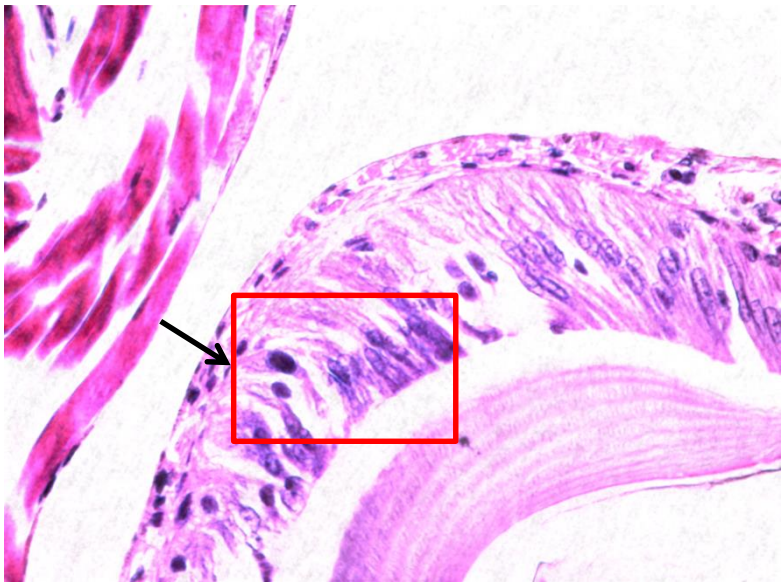


Figura 23. Imagen problema con presencia del VSMB.

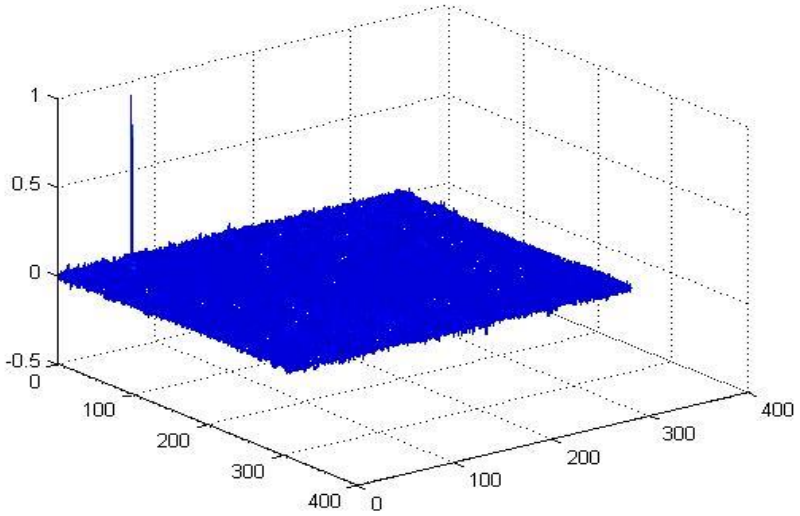
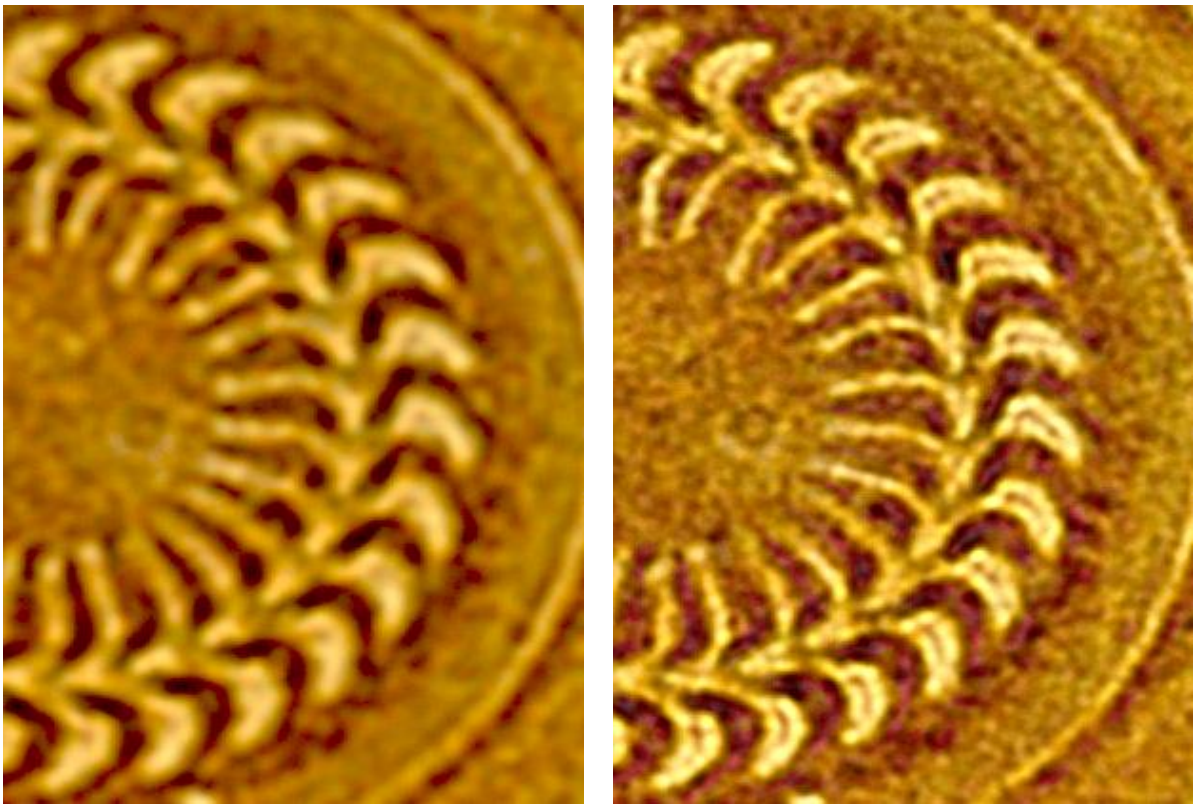


Figura 24. Pico de correlación.

Capítulo 4. Discusión

En este capítulo se discuten los resultados de los algoritmos de autoenfoque y fusión de imágenes, y se discuten y comparan los nuevos resultados obtenidos con las nuevas densidades espectrales binarias con la información existente.

4.1 Autoenfoque y fusión de imágenes



a) b)

Figura 25. Comparativa de imagen mejor enfocada a) e imagen fusionada b).

En la Figura 25 se puede observar la diferencia entre la imagen mejor enfocada y la imagen fusionada al analizar una pequeña sección de la imagen total (Figura 18). En la imagen mejor enfocada se observan los detalles difusos y en la imagen fusionada se pueden distinguir mejor los detalles finos, útiles para una identificación más precisa de un objeto. En nuestro caso, para identificar la presencia de cuerpos de inclusión del VSMB en tejido de camarón.

La fusión obtenida a través del valor máximo del módulo de la transformada de Fourier de cada pixel de las imágenes de la región de mejor enfoque, resulta en una imagen con la mejor información localizada a diferentes planos focales, es decir, la información del cuerpo volumétrico y no solo de un plano focal.

4.2 Densidades espectrales binarias e índices espectrales

La parte real de la transformada de Fourier y la parte imaginaria de la transformada de Fourier de una función presentan un contenido de frecuencias espectrales diferentes, por lo consecuente se obtienen densidades espectrales diferentes y se espera obtener rangos de índices espectrales distintos para la identificación del VSMB en tejido de camarón.

Las nuevas metodologías para calcular densidades espectrales binarias nos arrojan rangos de índices espectrales similares, los cuales fueron graficados con el programa STATISTICA 6 (Figura 26).

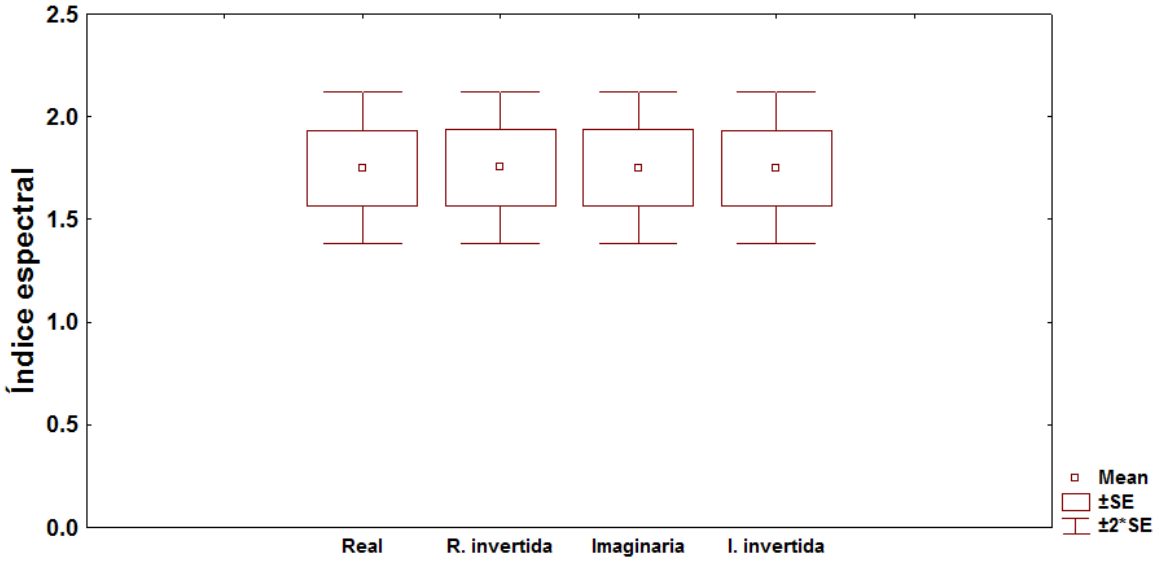


Figura 26. Gráfica de índices espectrales.

En la Figura 26 se puede observar que los nuevos intervalos de confianza de índices espectrales (R.invertida, Imaginaria, I.invertida) y el intervalo de confianza de índices espectrales existente (Real) con un $\pm 2ES$ no presentan una diferencia significativa, es decir, se puede trabajar con cualquier tipo de densidad espectral binaria obteniendo

los mismos resultados, por lo tanto, no importa cuál de las cuatro condiciones se utilice para calcular las densidades espectrales binarias, el nivel de confianza será el mismo: 95.4%.

4.3 Correlación no lineal adaptativa

Esta metodología no es aplicable para la identificación del VSMB mediante imágenes que contengan más de un cuerpo de inclusión porque no cumple con la Ec. (50) debido a que el $Promedio(IP)$ siempre será mayor que el $Promedio(IO)$ y no tendría la función de adaptarse. Una solución consistiría en segmentar cada cuerpo de inclusión del VSMB, lo que tomaría demasiado tiempo de cómputo, haciendo esta propuesta no aceptable.

La metodología mediante correlación no lineal es efectiva para identificar la presencia del VSMB en tejido de camarón. El asignar un valor umbral correcto para delimitar el pico máximo de correlación de una identificación positiva, disminuiría la obtención de picos falsos-positivos, haciendo el algoritmo más confiable.

Futuros trabajos para mejorar la metodología para identificar el VSMB en tejido de camarón mediante procesado de imágenes pudieran basarse en adaptarla para que pueda identificar la presencia del VSMB con fragmentos de cuerpos de inclusión, analizar las muestras sin el proceso de tinción, analizar las muestras en el espacio de color RGB completo, así como en otro espacio de color.

Capítulo 5. Conclusión

En este trabajo de investigación se estudió e implementó la matemática de la metodología existente para identificar el virus de la mancha blanca en tejido de camarón mediante el procesado de imágenes. La técnica utilizada involucró varios procesos: captura de imágenes en diferentes campos del tejido, de diferentes partes del cuerpo del camarón; uso del método de autoenfoque y fusión de imágenes logrando una imagen de muy alta calidad; uso de procesos de segmentación y sistemas automatizados para la generación de densidades espectrales binarias obtenidas bajo diferentes condiciones matemáticas.

El poder formar una imagen con los mejores pixeles de los diferentes campos del objeto a analizar, genera una imagen de muy buena calidad, que ayuda en la obtención de intervalos de confianza cortos y un nivel de confianza del 94.5 % en el algoritmo para la detección del VSMB mediante correlación no lineal.

Se desarrollaron tres nuevas condiciones matemáticas para la obtención de densidades espectrales binarias obteniendo como resultado intervalos de confianza similares entre sí, esto debido a que la diferencia de unos (1) en los datos de sus matrices no varía significativamente.

Al implementar la correlación no lineal adaptativa, no se logró beneficiar el rendimiento del algoritmo debido a que el uso de esta metodología en una imagen con más de un objeto nos lleva a más tiempo de cómputo por cada iteración de correlación, haciendo el algoritmo más tardado en la identificación del VSMB.

Se realizaron experimentos con las cuatro condiciones matemáticas para la obtención de densidades espectrales binarias y el método de correlación no lineal para diferentes imágenes de tejido de camarón para comprobar la eficiencia del algoritmo para identificar positivamente la presencia del VSMB, obteniendo un nivel de confianza del 94.5% en la identificación positiva.

Lista de referencias

Baxter K., Rigdon R., Hanna C. (1970). Pleistophora sp (Microsporidian: Nosematidae): a new parasite of shrimp. *Journal of Invertebrate. Pathology. 16(2),289-291*.

Brock J. A., Lightner D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *Diseases of marine animals, 3, 245-349*.

Bueno Ibarra, M. A. (2008). *Desarrollo de una tecnología sistematizada para la adquisición y análisis de partículas biogénicas*. Tesis de doctorado en ciencias. Instituto Politéncino Nacional. 247 p.

Bueno Ibarra, M.A., Chávez Sánchez, M.C., Álvarez-Borrego, J. (2010). Development of nonlinear K-law spectral signature index to classify basophilic inclusion bodies of the white spot syndrome virus. Biosciencesworld '10 Proceedings of the 2010 International Conference on Biosciences. pp 30-33

Bueno-Ibarra, M. A., Chávez-Sánchez, M. C., and Álvarez-Borrego, J. (2011). K-law spectral signature correlation algorithm to identify white spot syndrome virus in shrimp tissues. *Aquaculture 318(3): 283-289*.

Chou, H., Huang, C., Wang, C., Chiang, H., Lo C. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms, 23, 165-173.

Couch J. (1974). Free and occluded virus similar to Baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature, 247,* 229-231.

Durand S., Lightner D., Nunan L., Redman R., Mari J. and Bonami J. (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organism, 27(1), 59-66*.

Fimbres Castro, C., Álvarez Borrego, J. and Bueno Ibarra, M. (2012). Invariant nonlinear correlation and spectral index for diatoms recognition. *Optical Engineering*, 51(4), 047201, 1-4.

Gallardo-Escárate, C. (2005). *Análisis citogenético de tres especies de abulón de Baja California mediante procesamiento digital de imágenes.* Tesis de doctorado en ciencias. Centro de investigación científica de educación superior de Ensenada. Ensenada, B. C. 123 p.

Horner, J. L. and Gianino, P. D. (1984). Phase-only matched filtering. *Applied Optics,23(6)*, 812-816.

Kanchanaphum P., Wongteerasupaya C., Sitidilokratana N., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B., Flegel T. (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp Peneaus monodon. *Diseases of aquatic organisms. 34, 1-7*.

Kumar, B. Vijaya. and Hassebrook, L. (1990). Performance measures of correlation filters. *Applied Optics*, 29(20), 2997-3006.

Lightner D., and Redman R. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture 164(1), 201-220*.

Lightner D., Lewis D. (1975). A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fish. Rev. 37(5-6),25-28*.

Maeda, M., Itami, T., Kondo, M., Henning, O., Takahashi, Y., Hirono, I. and Aoki T. (1997). Characteristics of penaeid rod shaped DNA virus of kuruma shrimp. *In NRIA International Workshop. In: New approaches to viral disease of aquatic animals. Nansei, Mie, Japan: National Reserch Institute of Aquaculture (pp. 218-228)*.

Marges, M. (2004). *Procesamiento de imágenes policromáticas como método de diagnóstico del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. Tesis de maestría en ciencias. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, a.c. Mazatlan, Sinaloa. 106 p.

Mouriño, R. R. (1999). *Correlación óptica a color para la identificación de diferentes estados de Vibrio cholerae 01*. Tesis de doctorado en ciencias. Centro de Investigación cientifica y de educación superior de Ensenada. Ensenada, B.C. 120 p.

OIE. (2012). Manual of diagnostic test for aquatic animals. pp 177-190.

Rosenberry, B. (1996). World shrimp farming 1996. *Shrimp news international.* San Diego, CA.

Rosenberry, B. (2003). World shrimp farming 2003. *Shrimp news international.* San Diego, CA.

Solís, A. (2012). *Correlación no lineal invariante a posición y rotación utilizando máscaras adaptativas binarias.* Tesis de maestría en ciencias. Centro de

investigación cientifica y de educación superior de Ensenada, Ensenada, B.C. 64 p.

Takahashi Y., Itami T., Kondo M., Maeda M., Fuji R., Tomanaga S., Supamattaya K., and Boonyaratpalin S. (1994). Electrón microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (Penaeus japonicus)*. Fish. Pathology, 29, 121-121*.

Walker, P.J., Mohan, C.V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins impact and the effectiveness of healt management strategies. *Rev. Aquac.1(2),125-154*.

Wongteerasupaya C., Wongwisansri, S., Boonseang, V., Panyim, S. Pratanpipat, P., Nash, G.L., Whithayachumnarnkul, B., Flegel, T.W. (1996). DNA fragment of Penaeus monodon baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture 143(1), 23-32*.

Zar, J. H. (1996). “Biostatistical Analysis" (3a. ed.). *Prentice Hall, USA*, pp. 371-373.