

การนับพลัควัสดุโดยใช้ค่าขีดคู่และขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Viral plaque counting using double thresholds and watershed algorithm



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Electrical Engineering

Department of Electrical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การนับพลังไวรัสโดยใช้ค่าชืดคู่และขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ
โดย	น.ส.นิตยา คำดี
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒนา เอื้อทวิเกียรติ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิศาชล ตั้งเสงี่ยมวิสัย)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒนา เอื้อทวิเกียรติ)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.วีระ สอิ่ง)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นิตยา คำดี : การนับพลาคว์ไวรัสโดยใช้ค่าขีดคู่และขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ. (Viral plaque counting using double thresholds and watershed algorithm) อ.ที่ปรึกษาหลัก
: รศ. ดร.สุพัฒนา เอื้อทวีเกียรติ

การนับจำนวนไวรัสด้วยจำนวน Plaque Forming Unit (PFU) เพื่อทำการทดลองในด้านต่างๆ เช่นการผลิตวัคซีน สามารถทำได้ด้วยการใช้ตาเปล่าซึ่งส่งผลให้เกิดความเหนื่อยล้า ใช้เวลานานและเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย การนับด้วยวิธีที่รวดเร็วและแม่นยำต้องคำนึงหลายปัจจัยเนื่องจาก PFU มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบไม่เด่นชัด ขนาดไม่สม่ำเสมอ รวมถึงความแตกต่างกันของสีระหว่าง PFU และพื้นหลังภายในจานหลุมไม่คงที่ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสนอสร้างกรรมวิธีการนับ PFU แบบกึ่งอัตโนมัติจากภาพงานเพาะเลี้ยงที่ได้จากกล้องถ่ายรูปทั่วไปที่ไม่มีการควบคุมแสง เริ่มจากการจำแนก PFU กับพื้นหลังด้วยค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้ โดยถ้าเป็น PFU ขนาดเล็กจะใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนบริเวณขอบและกลางหลุมแตกต่างกัน ขณะที่ถ้าเป็น PFU ขนาดใหญ่จะใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนเดียวกันทั้งหลุม ปัญหาเรื่องสีที่ต่างกันถูกแก้โดยใช้ผลต่างของสองช่องสัญญาณในปริภูมิสี CIE-XYZ ที่มีการถ่วงน้ำหนักให้ความสว่างของพื้นหลังเท่ากัน การแบ่งพื้นที่ของ PFU ที่ติดกันประกอบด้วยสองส่วนคือ กระบวนการวิธีสันปันน้ำร่วมกับการแปลงระยะทางและการใช้เกณฑ์ขนาดร่วมกับการขยายของจุดศูนย์กลางที่ได้จากภาพการแปลงระยะทางเป็นวงกลม

จากการทดลองพบว่าเมื่อปรับค่าถ่วงน้ำหนักให้เหมาะสมแล้ว กรรมวิธีที่นำเสนอสามารถนับ PFU ผิดพลาดน้อยกว่าร้อยละ 10 สำหรับ PFU ที่เป็นสีขาว มีขอบราบเรียบและไม่มีรูตรงกลาง จึงสามารถนำมาใช้กับ PFU ของไวรัสไข้เลือดออก ไวรัสไข้ปวดข้อยูงลายและไวรัสไข้สมองอักเสบ การนับจะได้ผลผิดพลาดมากขึ้นสำหรับ PFU ที่มีสีชมพูปะปน เช่น ไวรัสไข้ชิกาและ PFU ที่มีขอบฟุ้ง เช่น PFU ของไวรัสโคโรนา

สาขาวิชา วิศวกรรมไฟฟ้า

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6270359221 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEYWORD: plaque assay, adaptive thresholding, watershed algorithm, morphology, image segmentation, image analysis

Nittaya Khamdee : Viral plaque counting using double thresholds and watershed algorithm.

Advisor: Assoc. Prof. SUPATANA AUETHAVEKIAT, Ph.D.

Virus counting via the number of Plaque Forming Unit (PFU) is conducted in various fields such as virus vaccine production. PFU counting can be done by naked eyes, however, it is exhaustive, time-consuming, and error-prone. There are many considerations for a fast and accurate counting method because the PFUs have varied shapes, ambiguous boundaries, and uneven sizes. The difference between PFU and background can be varied even within the same well. The semi-automatic PFU counting method is proposed in this dissertation. Adaptive thresholding is used to extract PFUs from the background. For small PFUs, different thresholding is used to extract the PFUs at the center and the edge of a well. For large PFUs, the same thresholding is used in both areas. The problem of varying staining color is solved by finding the difference of the weighted channels in CIE-XYZ color space. Two channels are weighted such that the background has similar brightness. The separation of connected PFUs consists of two stages: (1) watershed algorithm with distance transform and (2) the combination of area thresholding and the dilation of the distance transform center by circular structure element.

The experiment on PFUs stained with two different colors indicated that when the weight was appropriately set, the proposed method was able to separate PFUs from the background regardless of the staining color. The error of PFU count was less than 10% for the white PFU with smooth boundary and without hole inside such as the PFUs of Dengue virus, Chikungunya virus, and Japanese Encephalitis virus. The counting was less accurate when the PFU was pinkish such as the one of Zika virus or the boundary was corona-like such as the PFU of Coronavirus.

Field of Study: Electrical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดลในการเก็บรวบรวมข้อมูลและอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ รวมถึงให้คำปรึกษาตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณสัมพันธ์จิรา จันทรพรชัย ที่ให้ความร่วมมือในการจัดหาข้อมูลและให้การสนับสนุน ช่วยเหลือในทุกๆ ด้านซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร.สุพัฒนา เอื้อทวิเกียรติ ที่ให้คำปรึกษา ตรวจสอบ และแก้ไขข้อผิดพลาดทุกประการอันเป็นประโยชน์กระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.นิศาชล ตั้งเสงี่ยมวิสัย และ อ. ดร.วีระ สอิ่ง ที่แนะนำแนวทางและให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จ

นิตยา คำดี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 คำแถลงปัญหา (Problem statement)	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อนับ PFU.....	4
2.2 ขั้นตอนกรรมวิธีในการนับ PFU.....	4
2.3 งานที่เกี่ยวข้องกับการนับ PFU แบบอัตโนมัติ	6
2.3.1 จุดเด่นและจุดแตกต่างของงานที่เกี่ยวข้อง	10
2.4.1 ปริภูมิสี	13
2.4.2 วงจรกรองเพื่อลดสัญญาณรบกวน.....	14
2.4.3 ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัว (Adaptive thresholding).....	15
2.4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของเฟเรท (Feret's diameter) [21]	16
2.4.5 การแปลงระยะทาง (Distance transform) [22, 23]	16
2.4.6 สัณฐานวิทยาของภาพ (Image morphology) [24].....	17

2.4.7 ขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ (Watershed algorithm) [24].....	21
บทที่ 3 กรรมวิธีที่นำเสนอ.....	26
3.1 ลักษณะข้อมูล.....	26
3.2 การกำหนดขอบเขตของขนาดวินโดว์ของค่าขีดเริ่มเปลี่ยนปรับตัวได้	27
3.3 กรรมวิธีการนับ PFU ขนาดเล็ก	29
3.3.1 การแบ่งพื้นที่หลุม	30
3.3.2 การปรับปรุงรูปร่าง PFU และค้นหา PFU บริเวณขอบหลุม	33
3.3.3 การปรับปรุงรูปร่าง PFU.....	36
3.3.4 การแยก PFU ที่ติดกัน.....	37
3.4 กรรมวิธีการนับ PFU ขนาดใหญ่.....	40
3.5 การประยุกต์กับตัวอย่างที่ย้อมด้วยสีต่างกัน.....	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	74
5.1 สรุปผลการทดลอง	74
5.2 อภิปรายผล.....	75
5.3 จุดเด่น	76
5.4 ข้อจำกัด.....	76
5.5 ข้อเสนอแนะ.....	77
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก ก. ผลการนับของกรรมวิธีที่นำเสนอ.....	81
ประวัติผู้เขียน.....	121

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีในการตรวจจับวัตถุ (Object detection) มานับจำนวนหรือจำแนกประเภทของวัตถุทั้งขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีจุดประสงค์นำเทคโนโลยีนี้มาสร้างกรรมวิธีนับปริมาณไวรัส (Viral quantification) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการผลิตวัคซีน (Viral vaccine production) การวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อ (Infectious disease) รวมถึงการผลิตโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein)

วิธีนับปริมาณไวรัสที่นิยมคือ Plaque assay เนื่องจากใช้อุปกรณ์น้อยและทำได้ง่าย ปริมาณของไวรัสที่อยู่ในสารละลายจึงนับออกมาเป็นหน่วย Plaque Forming Unit (PFU) ต่อมิลลิลิตร (Plaque forming units per milliliter, PFU/ml) การนับแบบนี้ทำได้ด้วยตาเปล่า (Naked eye) แต่การนับปริมาณไวรัสในการทดลองหนึ่ง ๆ จะทำหลายครั้งกับสารละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จึงก่อเกิดความเมื่อยล้าทางสายตา (Eye strain) รวมถึงใช้เวลานาน นอกจากนี้ลักษณะของ PFU ที่ปรากฏในจานเพาะเชื้อ (Well plates) ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส (Types of viruses) เซลล์ที่ไวรัสเข้าไปอาศัย (Host) และสภาพการเจริญเติบโต (Growth conditions) ส่งผลให้มีความแตกต่างทั้งขนาด และสี ทั้งรูปร่างของ PFU ไม่เป็นวงกลมเด่นชัดเหมือนโคโลนีของแบคทีเรีย การนับ PFU ที่ซับซ้อนกันจึงได้จำนวนที่ต่างกันระหว่างผู้นับ ในการใช้งานจริงจึงใช้การนับซ้ำและพิจารณาเป็นแนวโน้ม

ในปัจจุบันมีอุปกรณ์นับ PFU อัตโนมัติเชิงพาณิชย์แต่อุปกรณ์เหล่านี้มีราคาสูง และใช้ซอฟต์แวร์กรรมสิทธิ์ (Proprietary software) ดังเช่น ViroCyt® virus counter (VC) [1] และ BioSpot® (<https://immunospot.com/plaque-colony-counting>) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังมีการสร้างกระบวนการนับ PFU ในจานเพาะเลี้ยง (Well plate) แบบอัตโนมัติขึ้นมาจำนวนมาก [2-7] รวมไปถึงทำเป็น Plug-in สำหรับโปรแกรม ImageJ [8] (<https://imagej.nih.gov/ij/>) ด้วย กรรมวิธีเหล่านี้ส่วนมากใช้ภาพจานเพาะเลี้ยงที่ถ่ายอยู่ในสภาวะควบคุม (Controlled environment) ทั้งในเรื่องแสง ตำแหน่งของจานเพาะเลี้ยง รวมไปถึงกรรมวิธีการขยายหลุม (Well) ให้ชัดเจนขึ้น [5] ส่งผลให้ไม่สามารถนำกรรมวิธีเหล่านี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงเสนอการนับจำนวน PFU ในจานเพาะเชื้อแบบกึ่งอัตโนมัติ (Semi-automatic) จากภาพที่ได้จากกล้องถ่ายรูปทั่วไป ซึ่งอาจเป็นกล้องของโทรศัพท์เคลื่อนที่ (Mobile

phone) หรือแท็บเล็ต (Tablet) ก็ได้ และมีข้อกำหนดเพียงให้ในแต่ละรูปประกอบด้วยหลุมเพาะ (Well) เพียงหนึ่งหลุมและขอบหลุมติดกับขอบรูปทั้งสี่ด้านและรูปภาพไม่มัวเท่านั้น

1.2 คำแถลงปัญหา (Problem statement)

1. กระบวนการประมวลผลภาพสามารถนำมาใช้เพื่อลดผลกระทบของแสงที่เข้ามาไม่สม่ำเสมอ และทำให้หาค้นหาพื้นที่ PFU ของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่
2. สามารถนำขนาด และการประมวลผลภาพเกี่ยวกับรูปร่าง (Morphological operations) มาใช้ตัดแยก PFU ที่ติดกันจากความเว้าแหว่ง และการเป็นส่วนที่ยื่นออกมาเล็กๆแทนการใช้รูปร่างของ PFU ได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สร้างกรรมวิธีการนับ PFU แบบกึ่งอัตโนมัติจากภาพงานเพาะเลี้ยงที่ได้จากกล้องถ่ายภาพทั่วไปที่ไม่มีการควบคุมแสง แต่ขอบหลุมติดกับขอบภาพทั้งสี่ด้าน
2. ออกแบบวิธีเพื่อให้ผู้ใช้สามารถปรับปรุงกรรมวิธีที่นำเสนอเพื่อไปนับ PFU ที่ได้จากการย้อมสี หรือไวรัสประเภทอื่นนอกเหนือจากที่ใช้ในงานวิจัยนี้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. กรรมวิธีที่นำเสนอออกแบบเพื่อนับ PFU ของไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus) ที่ย้อมด้วยสี Neutral red เท่านั้น
2. หลุมที่ปรากฏในรูปถูกถ่ายในแนวตั้งฉาก หรือเกือบตั้งฉาก และขอบของหลุมชิดกับขอบรูป
3. ผลการนับ PFU ที่ถูกต้องอ้างอิงจากผลการนับที่ได้จากห้องปฏิบัติการทั่วไป กล่าวคือเป็นผลการนับของผู้เชี่ยวชาญเพียง 1 คนเท่านั้น
4. ประเมินผลการนับจากจำนวน และตำแหน่งโดยไม่คำนึงถึงรูปร่างที่ตรวจจับได้ว่าจะสอดคล้องกับรูปร่าง PFU จริงหรือไม่
5. กรรมวิธีที่ได้เป็นโปรแกรมต้นแบบที่สร้างจากโปรแกรม MATLAB และใช้คำสั่งที่มีอยู่ในกล่องเครื่องมือ (Toolbox) และไลบรารี (Library) มาตรฐาน ดังนั้นไม่มีการประเมินเวลาที่ใช้ในการคำนวณ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. กรรมวิธีแบบกึ่งอัตโนมัติสำหรับนับ PFU สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ที่ผู้ใช้สามารถเก็บข้อมูลได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ
2. สามารถใช้เพื่อเพิ่มความเร็วในการนับ รวมถึงจำนวนตัวอย่างที่ต้องการนับ PFU ในแต่ละวันได้



บทที่ 2 ทฤษฎีและงานที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้จะเริ่มจากวิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อนับ PFU และบทความวิจัยกรรมวิธีประมวลผลภาพ เพื่อนับ PFU รวมไปถึงกรรมวิธีที่สามารถประยุกต์ใช้ในการนับ PFU ได้ ในส่วนสุดท้ายของบทนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีประมวลผลภาพที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีที่จะนำเสนอในบทที่ 3

2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อนับ PFU

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ใช้ PFU ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสไข้เลือดออกในเซลล์เยื่อบุไตของลิง (Rhesus monkey kidney epithelial cells, (LLC-MK₂ cells)) และมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

การเพาะเลี้ยงเซลล์ LLC-MK₂

1. ใส่สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตรปริมาณ 4 มิลลิลิตรในแต่ละหลุม (Well) ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ LLC-MK₂
2. บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C (35°C-39°C) ในตู้บ่มเซลล์ที่มีก๊าซ CO₂ 5% เป็นเวลา 6-8 วัน

การเพาะเลี้ยงไวรัสไข้เลือดออก

1. เติม overlay medium ด้วยปริมาณ 4 มิลลิลิตรในแต่ละหลุม
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (35°C-39°C) ในตู้บ่มเพาะเชื้อที่มีก๊าซ CO₂ 5% เป็นเวลา 7 วัน สำหรับไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus) ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4

2.2 ขั้นตอนกรรมวิธีในการนับ PFU

PFU มีลักษณะที่แตกต่างจาก Colony Forming Unit (CFU) ในรูปมีมากกว่า 1 แบบในแง่ที่ PFU มีรูปร่างไม่เป็นวงกลมเด่นชัดดัง CFU (รูปที่ 2-1) จึงต้องอาศัยความเฝ้าของขอบวัตถุมากกว่า การตรวจจำวงกลมด้วยกรรมวิธีแปลงแบบ Circular Hough ซึ่งเป็นกรรมวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการนับ CFU [9] [10] [11] อย่างไรก็ตามเรายังสามารถประยุกต์กรรมวิธีการนับโคโลนีของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit, CFU) เข้ามาได้ เนื่องจากมีหลายงานแยก CFU ที่ติดกันออกจากกันโดยอาศัยความเฝ้าของขอบวัตถุ [7, 12-18] และสังเกตได้ว่าถึงแม้ CFU จะมีรูปร่างกลมเด่นชัด (รูปที่ 2-1.(ii)) แต่กรรมวิธีเหล่านี้ยังมีขั้นตอนควบคุมความสว่างทั้งการครอบตัวอย่างด้วยกระดาษแข็ง [7] การ

ต่อ Arduino UNO board ควบคุมปริมาณแสง [12] การใช้แผ่นผ้าปิดแสงภายนอก [13] หรือ เครื่องมือที่มีลิ้นชักลดการกระจายของแสง [14]



Dengue virus (DENV)

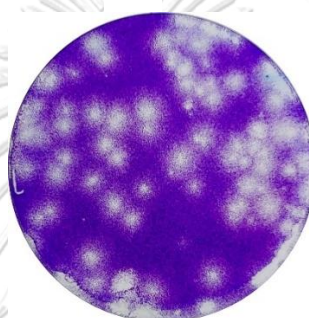
Japanese encephalitis

Zika virus (ZIKV)

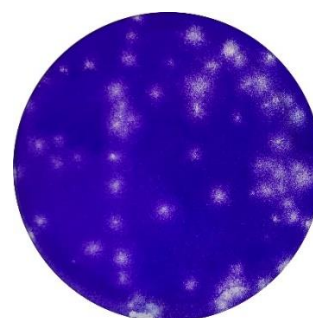
virus (JEV)



Chikungunya virus (CHIKV)

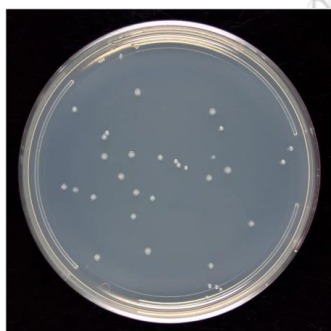


Coronavirus (CoV)



Coronavirus (CoV)

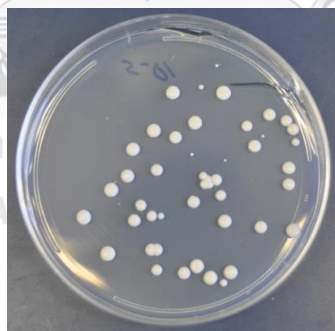
(i) PFU



Bacteria

(แหล่งที่มาของรูป:

<https://sitn.hms.harvard.edu/art/2018/colonies-on-a-plate/>



Yeast

(แหล่งที่มาของรูป: [https://](https://sciencebrewer.wordpress.com/2011/12/13/wild-yeast-isolated-from-cantillon-balbaer/)

sciencebrewer.wordpress.com/2011/12/13/wild-yeast-isolated-from-cantillon-balbaer/)

(ii) CFU



Mold

(แหล่งที่มาของรูป:

<https://www.sinusitiswellness.com/using-mold-plates-the-right-way-to-monitor-indoor-fungal-load-and-protect-your-health/>)

รูปที่ 2-1 ลักษณะของ PFU และ CFU ในงานเพาะเชื้อ

การนับ PFU และ CFU จากภาพถ่ายมีหลายกรรมวิธีแต่มีขั้นตอนคล้ายคลึงกันโดยสรุปได้ดังนี้

1. แปลงภาพที่นำเข้ามาให้เป็นภาพ Grayscale หรือใช้ปริภูมิสี (Color space) ที่เหมาะสม เช่น YIQ HSV RGB เป็นต้น
2. ปรับภาพให้เห็น PFU/CFU ได้เด่นชัด (Preprocess) เช่น ปรับความเข้มให้เป็นบรรทัดฐาน (Intensity normalization) เพิ่มความต่าง (Contrast) ของแสง/สี ลดสัญญาณรบกวน ทั้งนี้ กระบวนการนี้อาจจะทำหลังจากแยก PFU/CFU ก็ได้
3. แยก PFU/CFU ออกจากพื้นหลัง ซึ่งอาจใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (Threshold) เดียวกันทั้งภาพ เช่นค่าขีดเริ่มเปลี่ยนของ Otsu (Otsu's thresholding) หรือเป็นค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัว (Adaptive thresholding) ก็ได้
4. แยก PFU/CFU ที่ติดกันโดยอาศัยความเว้าแหว่ง ซึ่งนิยมใช้ขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ (Watershed algorithm) ร่วมกับการแปลงระยะทาง (Distance transform)
5. เปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของ PFU/CFU หรือกำจัดรูปร่างที่มีขนาดเล็ก ด้วยวงจรรองแบบหมวกสูง (Top-hat filter) วงจรรองแบบหมวกต่ำ (Bottom-hat filter) หรือการเปิด (Opening) เป็นต้น

2.3 งานที่เกี่ยวข้องกับการนับ PFU แบบอัตโนมัติ

PFU มีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของไวรัส เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมไปถึงผลจากวัคซีนที่ทำให้ PFU มีขนาดเล็กลง ดังนั้นในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนับ PFU บนรูปของหลุมของจานเพาะเลี้ยงส่วนมากกำหนดให้ใช้ภาพที่มีความคมชัด และการเก็บข้อมูลอยู่ในสถานะที่ควบคุม ดังเช่นในงานของ Moorman และ Dong [5] Premsattham และคณะ [6] Claytor [7]

ลักษณะกรรมวิธีการนับ PFU/CFU ส่วนมากจะแปลงภาพสีที่มีข้อมูล 3 มิติเป็นภาพที่มีความเข้มเพียง 1 มิติ โดยเลือกใช้ปริภูมิแสดงค่าแกนตามความเหมาะสม สำหรับการแบ่ง PFU นิยมใช้การแปลงระยะทาง (Distance transform) แทนการหาวงกลม เช่น การแปลงแบบ Circular Hough เนื่องจาก PFU มีลักษณะวงกลมไม่เด่นชัด ตัวอย่างกรรมวิธีนับ PFU และ CFU สรุปไว้ในตารางที่ 1 เมื่อภาพ Gray-scale หมายถึงการสร้างค่าขีดเริ่มเปลี่ยนเมื่อแปลงรูปให้เหลือช่องสัญญาณเพียง 1 ช่อง (Channel) ขณะที่ภาพสี (Color) หมายถึงใช้ช่องสัญญาณทั้ง 3 ช่อง ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบ

Global หมายถึงใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนเดียวกันทั้งภาพและแบบ Local หมายถึงเป็นค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้ แบ่งพื้นที่คิดเป็นแต่ละบริเวณ

การควบคุมสภาวะแวดล้อมโดยเฉพาะปริมาณแสงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการออกแบบกรรมวิธี เนื่องจากภาพที่ได้จะมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนี้

1. ภาพที่ไม่ถูกควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ถึงแม้พื้นหลังและ PFU/CFU แยกกันค่อนข้างชัดเจนเมื่อมองด้วยตาเปล่าแต่ภาพที่ถ่ายออกมาจะมีองค์ประกอบอื่นปะปนหรือมีความสว่างไม่สม่ำเสมอด้วย เช่น การสะท้อนระหว่างแสงจากหลอดไฟกับหลุมหรือจานเพาะเชื้อทำให้เกิดเป็นอีกวัตถุหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงของสีและความคมชัดภายในภาพ นอกจากนั้นภาพสามารถเบลอได้หากอุปกรณ์ไม่อยู่นิ่ง

2. ภาพที่ถูกควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ทำให้มีแสงจากภายนอกมารบกวนน้อย รวมถึงอาจมีการปรับปริมาณและทิศทางของแสงทำให้มีความสว่างสม่ำเสมอ ความต่างระหว่างพื้นหลังและ PFU/CFU เด่นชัดทั้งจากการมองด้วยตาเปล่าและถ่ายภาพส่งผลให้การประมวลผลทำได้ง่ายขึ้น

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการนับ PFU/CFU แบบอัตโนมัติ

Procedure Research	Data type	Environment control	Preprocessing	PFU/CFU extraction				PFU/CFU separation & postprocessing
				Image type		Thresholding		
				Gray-scale	Color	Global	Local	
Moorman et. al [5]	PFU	-	-	✓	-	✓	-	A combination of an eroded and dilated image for plaque counting
Premstatham et. al [6]	PFU	✓	✓	✓	-	✓	-	Distance transform and watershed algorithm
Claytor [7]	PFU/CFU	✓	✓	✓	-	✓	-	Two processes: 1. Distance transform and watershed algorithm 2. Locating regional maxima
Chiang et. al [13]	CFU	✓	✓	✓	-	✓	-	Distance transform and watershed algorithm

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบกรรมวิธีการนับ PFU/CFU แบบอัตโนมัติ (ต่อ)

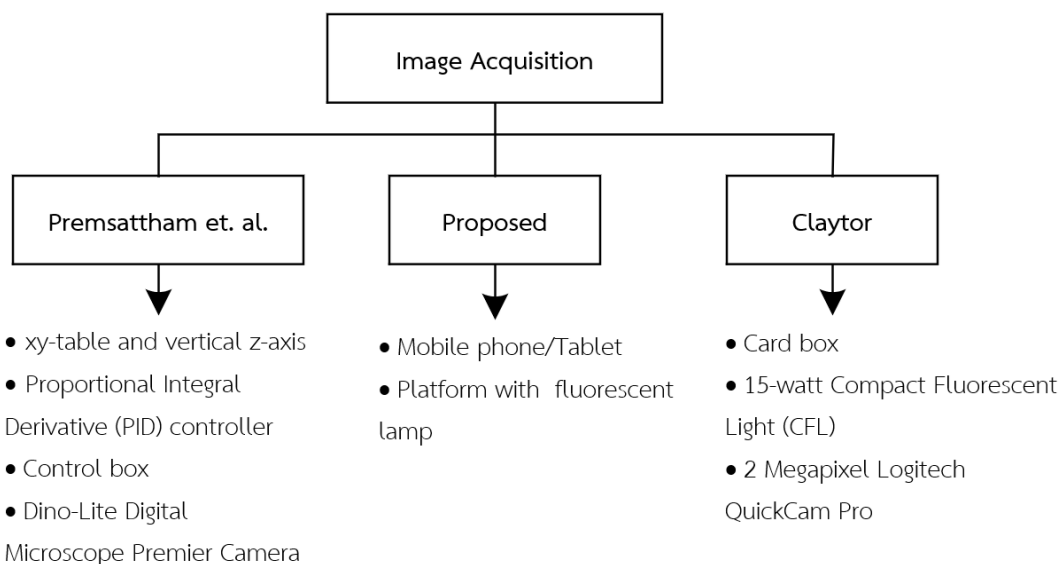
Procedure Research	Data type	Environment control	Preprocessing	PFU/CFU extraction				PFU/CFU separation & postprocessing
				Image type		Thresholding		
				Gray-scale	Color	Global	Local	
Martinez et. al [12]	CFU	✓	✓	-	✓	✓	-	Distance transform and thresholding
Hu [15]	CFU	-	✓	-	✓	✓	-	Distance transform and progressive erosion
Uppal et. al [16]	CFU	✓	✓	-	✓	✓	-	Distance transform and watershed algorithm
Liu et. al [17]	CFU	-	✓	-	✓	✓	-	Distance transform and watershed algorithm
Brugger et. al [14]	CFU	✓	✓	-	✓	-	✓	Distance transform and watershed algorithm
Zhang et. al [18]	CFU	-	-	✓	✓	✓	-	Distance transform and watershed algorithm

2.3.1 จุดเด่นและจุดแตกต่างของงานที่เกี่ยวข้อง

การเริ่มต้นสำหรับนับ PFU/CFU เริ่มจากใช้อุปกรณ์เก็บภาพงานเพาะเชื้อ โดยแต่ละวิธีการได้มาของภาพก็จะมี ความแตกต่างกัน ในวิทยานิพนธ์นี้จะมุ่งเปรียบเทียบเฉพาะงานวิจัยที่เสนอ การนับ PFU และเลือกกรรมวิธีของ Premasattham [6] และคณะ และ Claytor [7] มาเปรียบเทียบ เราไม่เลือกใช้กรรมวิธีของ Moorman และคณะ ถึงแม้ว่าจะเป็นการใช้ภาพที่ไม่มีการควบคุม สภาพแวดล้อม เนื่องจากเป็นกรรมวิธีที่ออกแบบมาใช้กับภาพที่มี PFU โดดเด่น เมื่อใช้กับ PFU ทั่วไป จะปรับค่าพารามิเตอร์การเปิด (Opening) และการขยายขนาด (Dilation) ได้ยาก

วิธีของ Premasattham และคณะและ Claytor บริเวณที่สนใจ (Region of Interest, ROI) มีแสง สี ขนาดของ PFU ค่อนข้างเท่ากันทุกภาพ ส่วนวิธีที่นำเสนอใช้ภาพจากกล้องทั่วไปจึงเกิดการ คลาดเคลื่อนของแสง สีได้ แต่มีการควบคุมขนาดด้วยการกำหนดให้ภาพหลุมจะต้องอยู่ชิดกับ ขอบภาพทั้งสองด้าน

วิธีของ Premasattham และคณะใช้กับงานเพาะขนาด 96 หลุม สำหรับวิธีของ Claytor นั้น มีจุดเด่นในเรื่องการควบคุมแสงจากภายนอกและการกระจายของแสงจากภายใน ทำให้สีหรือลักษณะ ภายในแต่ละหลุมไม่ผิดเพี้ยน การเปรียบเทียบอุปกรณ์ที่ติดตั้งสำหรับถ่ายรูปของวิธีที่นำเสนอ Premasattham และคณะ [6] และ Claytor [7] แสดงดังรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 วิธีการได้มาของภาพ

การนับ PFU/CFU ของงานที่เกี่ยวข้องมีกรรมวิธีดังต่อไปนี้

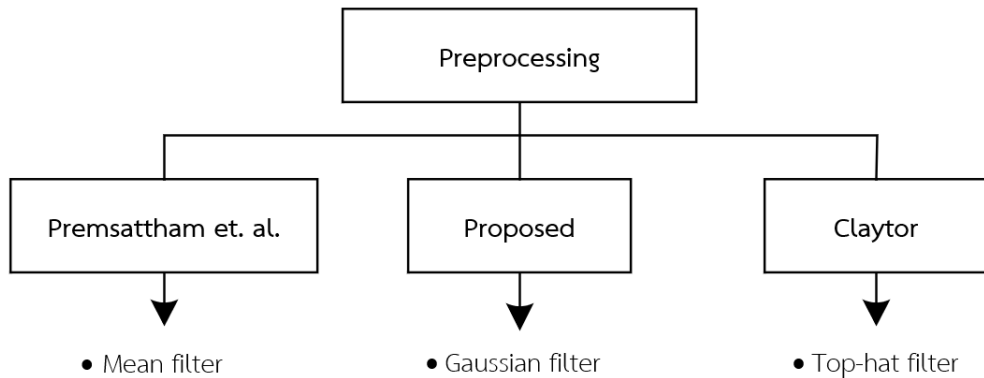
กรรมวิธีของ Premsattham และคณะ [6]

1. จำแนกกลุ่มของแต่ละภาพด้วยการจับคู่โดยยึดรูปร่างเป็นฐาน (Shape-Based Matching) บนซอฟต์แวร์ฮาลคอน (Halcon software) ซึ่งบริเวณรอบ ๆ หลุมเป็นสีดำและหลุมไม่ติดกับขอบภาพทั้งสี่ด้าน
2. ลดสัญญาณรบกวนด้วยการเบลอภาพโดยวงจรรองเฉลี่ย (Mean filter)
3. กำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (Threshold) เพื่อจำแนกพื้นที่ PFU จากพื้นหลัง (Background)
4. แยกส่วนพื้นที่ของ PFU ที่เชื่อมต่อกันด้วยการแปลงระยะทาง (Distance transform) และขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ (Watershed algorithm)

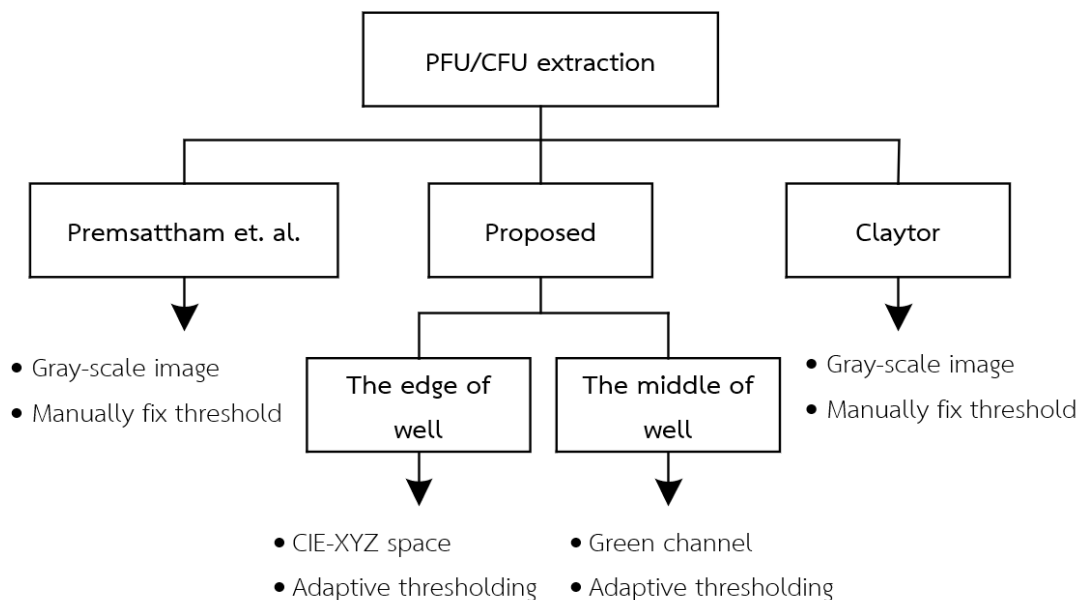
กรรมวิธีของ Claytor [7]

1. ใช้กล่องกระดาษที่มีพื้นผิวเป็นสีทึบเพื่อจำแนกแต่ละหลุมทำให้รอบนอกเป็นสีดำ ขอบหลุมไม่ติดกับขอบภาพทั้งสี่ด้าน
2. เกลี่ยความสว่างและเพิ่มความชัดเพื่อแยกองค์ประกอบของ PFU/CFU จากรายละเอียดของภาพด้วยวงจรรองแบบหมวกสูง (Top-hat filter)
3. แบ่งพื้นที่ระหว่าง PFU/CFU และพื้นหลังด้วยการใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบกำหนดด้วยตัวเอง
4. แยก PFU/CFU ที่ติดกันด้วยการแปลงระยะทางและขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ

เนื่องจากภาพตัวอย่างที่ใช้ของแต่ละวิธีมีรายละเอียดที่แตกต่างกัน การเลือกใช้กรรมวิธีประมวลผลที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับลักษณะของภาพ การเพิ่มความชัดให้กับพื้นหน้าด้วยวิธีเบลอและลดสัญญาณรบกวนดังเช่น กรรมวิธีที่นำเสนอและ Premsattham และคณะ ส่งผลให้สีพื้นหลังที่ไม่ราบเรียบเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้นแต่ทำให้ความแตกต่างของ PFU บางตัวกับพื้นหลังน้อยลงไปด้วย ในกรณีของวิธี Claytor พื้นหลังค่อนข้างเรียบและมีสีทึบ จึงใช้วงจรรองแบบหมวกสูงมาเพื่อเกลี่ยความสว่างและใช้วิธีแยก PFU ซึ่งเป็นองค์ประกอบเล็กที่มีความสว่างมากกว่าพื้นหลัง การประมวลผลภาพให้ PFU เด่นชัด แต่ละวิธีแสดงดังรูปที่ 2-3

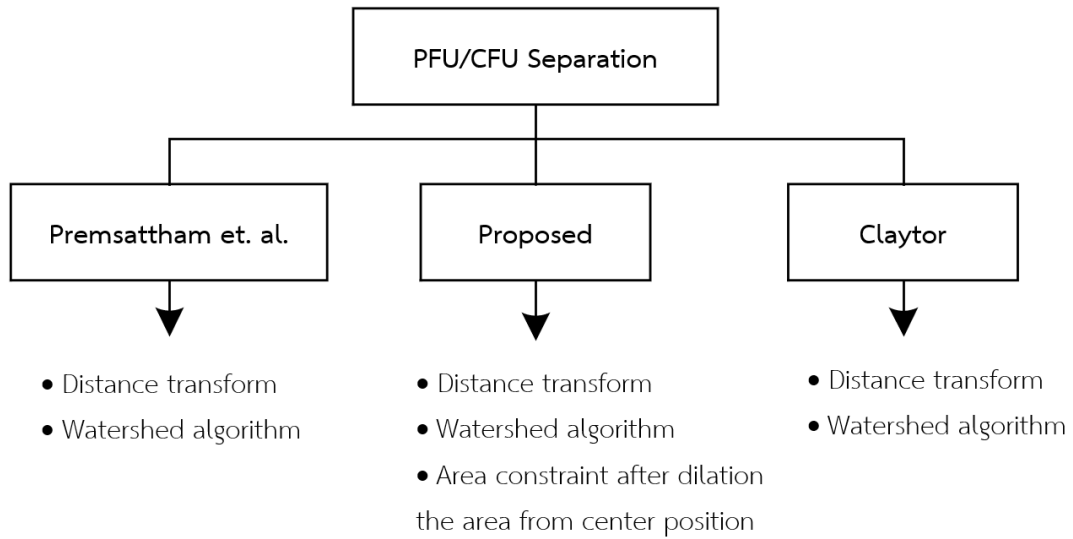


รูปที่ 2-3 วิธีประมวลผลภาพของ PFU ให้เด่นชัด



รูปที่ 2-4 วิธีหาพื้นที่ PFU

การจำแนก PFU/CFU ออกจากพื้นหลังทำได้ทั้งจากความสว่างของภาพระดับสีเทา (Gray-scale) หรือจากช่องสัญญาณในปริภูมิสี กรรมวิธีของ Premsattham และคณะและ Claytor เลือกใช้ภาพระดับสีเทา ในขณะที่วิธีที่นำเสนอใช้ภาพจากช่องสัญญาณสีเขียว (Green channel) สำหรับพื้นที่กลางหลุมและผลบวกเชิงเส้นของช่องสัญญาณในปริภูมิสี CIE-XYZ สำหรับพื้นที่บริเวณขอบหลุม ดังรูปที่ 2-4 ทั้งสามกรรมวิธีแบ่งพื้นที่ PFU/CFU ที่ติดกันด้วยวิธีการแปลงระยะทางร่วมกับวิธีสันปันน้ำ แต่กรรมวิธีที่นำเสนอยังมีการใช้เกณฑ์พื้นที่เพื่อแยกบริเวณขนาดใหญ่ที่มีความเว้าแหว่งน้อยเพิ่มขึ้นมา ดังรูปที่ 2-5



รูปที่ 2-5 วิธีแยกพื้นที่ที่ติดกันของ PFU

2.4 กรรมวิธีการประมวลผลภาพที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 ปริภูมิสี

2.4.1.1 ปริภูมิสีแบบ CIE-XYZ [19, 20]

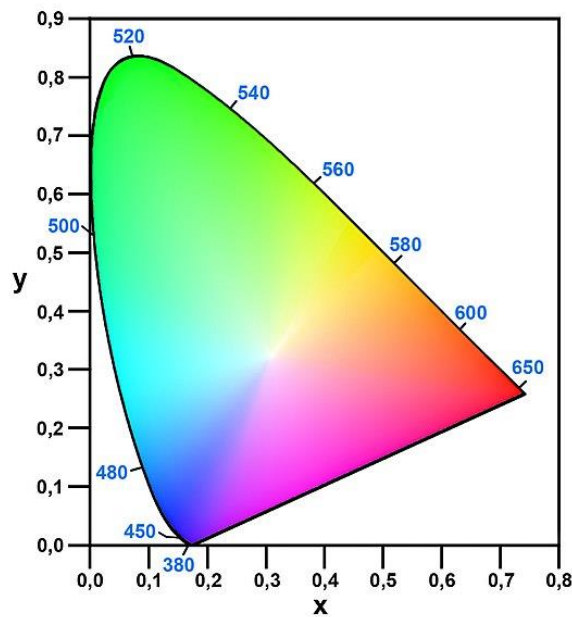
การแสดงผลสีมีได้หลายปริภูมิ เช่น RGB HSV CIE-LAB ฯลฯ การเลือกปริภูมิขึ้นกับจุดประสงค์ของงาน เช่น ปริภูมิ RGB เหมาะกับการแสดงสีของจอภาพ (Display) ปริภูมิสี HSV เหมาะกับการแบ่งสีตามเฉดสีแต่ไม่เหมาะกับการคำนวณความต่างของสี เนื่องจากเป็นปริภูมิเชิงทรงกระบอก ปริภูมิ CIE-LAB และ CIE-LUV เหมาะกับการแสดงสีที่ต้องการวัดระยะทางยูคลิดให้ใกล้เคียงกับความรู้สึคนุษย์เป็นต้น

ในวิทยานิพนธ์นี้เลือกการแสดงผลในปริภูมิ CIE-XYZ เนื่องจากเป็นปริภูมิที่แสดงตำแหน่งของสีที่ตามองเห็นตาม Chromaticity Diagram (รูปที่ 2-6) เพื่อให้สามารถคำนวณความต่างของสีได้ในระนาบ 2 มิติ ปริภูมิ CIE-XYZ มีความสัมพันธ์กับปริภูมิ RGB ดังสมการที่ (1)

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \frac{1}{0.17697} \begin{bmatrix} 0.49000 & 0.31000 & 0.20000 \\ 0.17697 & 0.81240 & 0.01063 \\ 0.0000 & 0.01000 & 0.99000 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

เมื่อ XYZ และ RGB คือค่าในแต่ละแกนของปริภูมิ CIE-XYZ และ CIE-RGB

ตามลำดับ



รูปที่ 2-6 Chromaticity Diagram

(แหล่งที่มา:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CIE_1931_Chromaticity_Diagram.jpg#filelinks)

2.4.2 วงจรกรองเพื่อลดสัญญาณรบกวน

วงจรกรองที่นิยมใช้ในการลดสัญญาณรบกวนสามารถแบ่งออกเป็นวงจรกรองแบบเชิงเส้น (Linear filter) และแบบไม่เชิงเส้น (Non-linear filter) วงจรกรองพื้นฐานที่นิยมใช้ในการลดสัญญาณรบกวนคือ วงจรกรองเฉลี่ย (Average filter) วงจรกรองเกาส์เซียน (Gaussian filter) สำหรับสัญญาณรบกวนแบบเกาส์เซียน (Gaussian noise) และวงจรกรองมัธยฐาน (Median filter) สำหรับสัญญาณรบกวนแบบ Salt and pepper ในวิทยานิพนธ์นี้เลือกใช้วงจรกรองแบบเกาส์เซียนสำหรับลดทอนสัญญาณรบกวน

2.4.2.1 วงจรกรองเกาส์เซียน

เป็นวงจรกรองผ่านต่ำ (Low-pass filter) ที่ใช้ฟังก์ชันเกาส์เซียน (Gaussian function) แบบ 2-D เป็นฟังก์ชันถ่วงน้ำหนักความสว่าง ดังสมการที่ (2)

$$G(s, t) = \frac{1}{2\pi\sigma} e^{-\frac{s^2+t^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

เมื่อ $G(s, t)$ คือแกนของเกาส์เซียน (Gaussian kernel) ซึ่ง s และ t เป็นระยะทางจากจุดกำเนิดในแกนนอน (Horizontal axis) และแกนตั้ง (Vertical axis) ตามลำดับ

σ คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการแจกแจงแบบเกาส์เซียน (Gaussian distribution)

e คือค่าคงตัวของออยเลอร์ (Euler's number)

ผลลัพธ์ของวงจรรองเกาส์เซียนมีค่า ดังสมการที่ (3)

$$\hat{f}(x, y) = \frac{\sum_{(r,c) \in S_{xy}} G(r-x, c-t)g(r, c)}{\sum_{(r,c) \in S_{xy}} G(r-x, c-t)} \quad (3)$$

เมื่อ $g(r, c)$ คือค่าพิกเซลบนพิกัด (r, c) ของภาพภายในวินโดว์

$\hat{f}(x, y)$ คือผลลัพธ์ของวงจรรองที่ตำแหน่ง (x, y)

S_{xy} คือพิกัดของวินโดว์ที่มีพื้นที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด $m \times n$ โดยมีตำแหน่ง (x, y) เป็นจุดศูนย์กลาง

2.4.2.2 วงจรรองเฉลี่ย

วงจรรองค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Arithmetic mean filter) เป็นวงจรรองง่ายที่สุดที่มักใช้ในการลดสัญญาณรบกวนแบบเกาส์เซียน เขียนได้ดังสมการที่ (4)

$$\hat{f}(x, y) = \frac{1}{mn} \sum_{(r,c) \in S_{xy}} g(r, c) \quad (4)$$

2.4.3 ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัว (Adaptive thresholding)

การใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (Thresholding) เป็นกรรมวิธีที่ง่ายและนิยมใช้ในการจำแนกบริเวณ PFU/CFU ออกจากพื้นหลัง ผู้ใช้สามารถกำหนดว่าบริเวณที่สนใจ (ROI) เป็นบริเวณที่มีค่าสูงกว่าหรือต่ำกว่าค่าขีดเริ่มเปลี่ยน การแบ่งภาพเป็นสองบริเวณด้วยค่าขีดเริ่มเปลี่ยนนิยมทำกับภาพที่สามารถอธิบายบริเวณที่ต่างกันด้วยปริมาณหนึ่งมิติ เช่น ความสว่าง ดังนั้นกรรมวิธีส่วนใหญ่จึงแปลงข้อมูลสี 3 มิติเป็นภาพความสว่าง (Luminance) ก่อนจะแบ่งภาพด้วยค่าขีดเริ่มเปลี่ยน

ในวิทยานิพนธ์นี้ไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมในการเก็บข้อมูล ดังนั้นความสว่าง และความต่าง (Contrast) ไม่จำเป็นต้องสม่ำเสมอทั้งภาพ จึงเลือกใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวและมีขั้นตอนการคำนวณค่าขีดเริ่มเปลี่ยนสำหรับตำแหน่ง (x_0, y_0) ดังต่อไปนี้ [26]

1. กำหนดให้ขนาดของวินโดว์ที่ใช้คำนวณค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวเป็น $s \times s$ จุดภาพและค่าความไว (Sensitivity) มีค่าเท่ากับ t ($0 \leq t \leq 100$)
2. จากผลรวมความเข้มภายในบริเวณ $x_0 - 0.5s < x \leq x_0 + 0.5s$ และ $y_0 - 0.5s < y \leq y_0 + 0.5s$ เราสามารถคำนวณค่าขีดเริ่มเปลี่ยนของตำแหน่ง (x_0, y_0) ได้ดังสมการที่ (5)

$$T_{adaptive} = \frac{100 - t}{100} \cdot \frac{1}{s^2} \left(\sum_{y=y_0-0.5s}^{y_0+0.5s} \sum_{x=x_0-0.5s}^{x_0+0.5s} I(x, y) \right) \quad (5)$$

เมื่อ $T_{adaptive}$ คือค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้

$I(x, y)$ คือค่าความเข้ม (intensity) ที่ตำแหน่ง (x, y)

จากสมการที่ (5) เราสามารถอธิบายค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวมีค่าเท่ากับ $(100 - t)\%$ ของค่าเฉลี่ยความเข้มภายในวินโดว์ขนาด $s \times s$ จุดภาพที่มี (x, y) เป็นจุดศูนย์กลาง และพื้นที่ PFU คือบริเวณที่มีความเข้มสูงกว่า $T_{adaptive}$

2.4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของเฟเรท (Feret's diameter) [21]

เนื่องจาก PFU มีรูปร่างไม่แน่นอน ในการวัดขนาดจึงเลือกใช้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเฟเรทซึ่งวัดขนาดเป็นระยะที่กว้างที่สุดของวัตถุ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของเฟเรทคือการวัดส่วนที่กว้างที่สุดด้วยก้ามวัด (Caliper) จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของก้ามวัด (Caliper diameter)

2.4.5 การแปลงระยะทาง (Distance transform) [22, 23]

การแปลงระยะทางเป็นกระบวนการหนึ่งของภาพไบนารี (Binary image) และแสดงผลลัพธ์เป็นระยะทางจากจุดภาพ (Pixel) ไปบริเวณที่สนใจ (Region of Interest, ROI) ที่ใกล้ที่สุด หากเราพิจารณา ROI เป็นพื้นหน้า (Foreground) แล้วจุดภาพที่เป็นพื้นหน้าจะได้ผลลัพธ์เป็น 0 ขณะที่จุดภาพที่เป็นพื้นหลัง (Background) จะได้ผลลัพธ์เป็นระยะทางไปหาพื้นหน้าที่ใกล้ที่สุด

ผลการแปลงระยะทางขึ้นกับฟังก์ชันที่ใช้คำนวณระยะทาง ตัวอย่างของฟังก์ชันที่ใช้สำหรับระยะทางภายในรูปภาพ 2 มิติระหว่างจุด $p(x_1, y_1)$ และ $q(x_2, y_2)$ มีดังต่อไปนี้ เมื่อกำหนดให้ $\Delta x = x_1 - x_2$ และ $\Delta y = y_1 - y_2$

1. ระยะทางแบบยูคลิด (Euclidean distance) เป็นระยะในแนวเส้นตรงตามทฤษฎีพีทาโกรัสตามสมการที่ (6)

$$D_{Euclid}(p, q) = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2} \quad (6)$$

2. ระยะทางแมนฮัตตัน (Manhattan distance) หรือ City block เป็นผลรวมแตกต่างแบบสัมบูรณ์ระหว่างระยะทางในแกน x และ y ตามสมการที่ (7)

$$D_{City}(p, q) = |\Delta x| + |\Delta y| \quad (7)$$

3. ระยะทางแบบเชบิเชฟ (Chebyshev distance) หรือระยะทางตารางหมากรุก (Chess board distance) แสดงระยะห่างเป็นระยะที่มากที่สุดในแต่ละแกน (กล่าวอีกนัยหนึ่งคือเป็น ℓ^∞ -norm และได้ระยะทางตามสมการที่ (8)

$$D_{Chess}(p, q) = \max(|\Delta x|, |\Delta y|) \quad (8)$$

4. ระยะทางแบบกึ่งยูคลิด (Quasi-Euclidean distance) เป็นผลบวกระหว่างระยะในแนวเส้นตรงที่ยาวที่สุดร่วมกับระยะตามแนวเส้นทแยงมุม (Diagonal line) ดังสมการที่ (9)

$$D_{Quasi}(p, q) = \begin{cases} |\Delta x| + (\sqrt{2} - 1)|\Delta y|, & |\Delta x| > |\Delta y| \\ (\sqrt{2} - 1)|\Delta x| + |\Delta y|, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (9)$$

2.4.6 สัณฐานวิทยาของภาพ (Image morphology) [24]

สัณฐานวิทยาของภาพไบนารีประกอบด้วยตัวดำเนินการ (Operator) สองตัวคือ ตัวดำเนินการกัดกร่อน (Erosion) และตัวดำเนินการขยายขนาด (Dilation) และนำตัวดำเนินการสองตัวนี้มาประกอบกันเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ต้องการเช่น ถมรู ตัดส่วนเว้าแหว่ง ฯลฯ

ตัวดำเนินการกัดกร่อนเป็นการลดขนาดของวัตถุในภาพไบนารีโดยตัดส่วนเว้าแหว่งที่อ้างอิงจากองค์ประกอบโครงสร้าง (Structure element, SE) หรือแก่น (Kernel) และเขียนเป็นตามสมการที่ (10)

$$A \ominus B = \{z | (B)_z \cap A^c \neq \emptyset\} \quad (10)$$

เมื่อ \ominus คือตัวดำเนินการกัดกร่อน

A คือภาพไบนารีที่ 1 และ 0 แสดงตำแหน่งของพื้นหน้า (วัตถุ) และพื้นหลังตามลำดับ

A^C คือส่วนเติมเต็ม (Complement) ของ A กล่าวคือ 1 และ 0 แสดงตำแหน่งของพื้นหลังและวัตถุตามลำดับ

B คือ SE ที่มีจุดกึ่งกลางอยู่ที่ (0,0) (สังเกตว่า B มีพิกัดทั้งบวกและลบ)

z คือ ระยะเลื่อน (Translation) มีค่าเท่ากับ (z_x, z_y)

$(B)_z$ คือการเลื่อน B ไปเป็นระยะ z กล่าวคือย้ายจุดกึ่งกลางของ B จาก (0,0) ไปตำแหน่ง (z_x, z_y)

\emptyset คือเซตว่าง (Null set)

จากสมการที่ (10) เราสามารถพิจารณาว่าตัวดำเนินการกัดกร่อนจะค้นหาตำแหน่งภายในภาพ A ที่เมื่อวาง SE ลงไปแล้ว SE จะไม่ยื่นออกมาทับพื้นหลังเลย ผลการใช้ตัวดำเนินการกัดกร่อนจะตัดส่วนเว้าแหว่งของวัตถุในภาพ A ออกไปได้ดังตัวอย่างในรูปที่ 2-7

ตัวดำเนินการขยายขนาดเป็นการเพิ่มขนาดวัตถุภายในภาพด้วยการถมส่วนเว้าแหว่งหรือรูไปโดยอ้างอิงรูปร่างการถมจาก SE ตามสมการที่ (11)

$$A \oplus B = \{z \mid (B)_z \cap A \neq \emptyset\} \quad (11)$$

เมื่อ \oplus คือตัวดำเนินการขยายขนาด

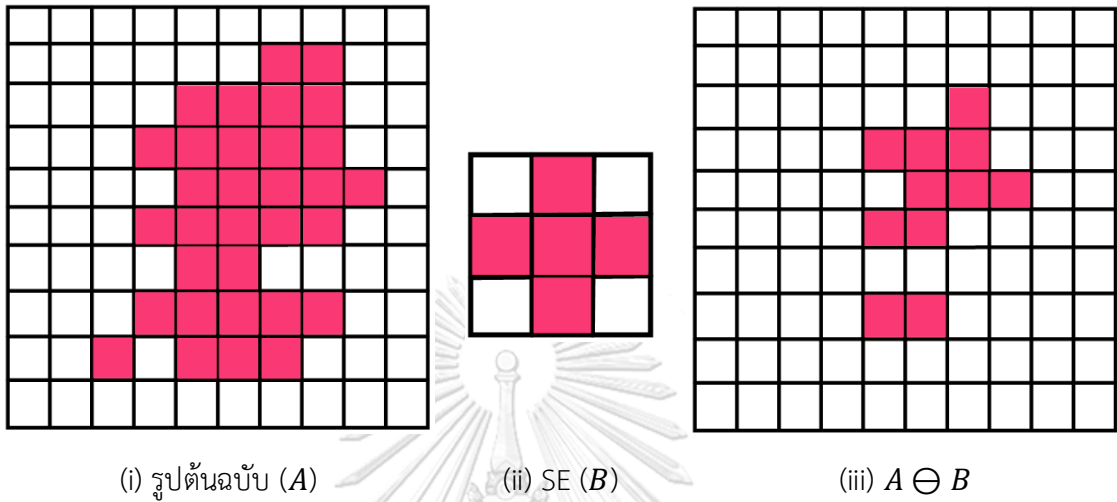
\hat{B} คือภาพสะท้อน (Reflection) ของ B กล่าวคือค่าที่ตำแหน่ง (x, y) ของ \hat{B} จะเท่ากับค่าที่ตำแหน่ง $(-x, -y)$ ของ B

ตัวดำเนินการขยายขนาดได้ผลลัพธ์คือตำแหน่งที่เมื่อวาง \hat{B} ไปบนภาพ A แล้วจะมีส่วนของ \hat{B} ซ้อนทับกับวัตถุในภาพ ลักษณะของการวางภาพสะท้อนนี้คล้ายกับการทำสังวัตนาการ (Convolution) หนึ่งโดยมากแล้ว SE มีรูปร่างสมมาตรทั้งแกน x และแกน y ดังนั้นผลการดำเนินการขยายขนาดจะได้ผลลัพธ์เสมือนเป็นการทำยูเนียน (Union) ของ $(B)_z$ เมื่อ z เป็นระยะเลื่อนให้จุดศูนย์กลางของ B ไปอยู่ภายใน A ทุกตำแหน่ง

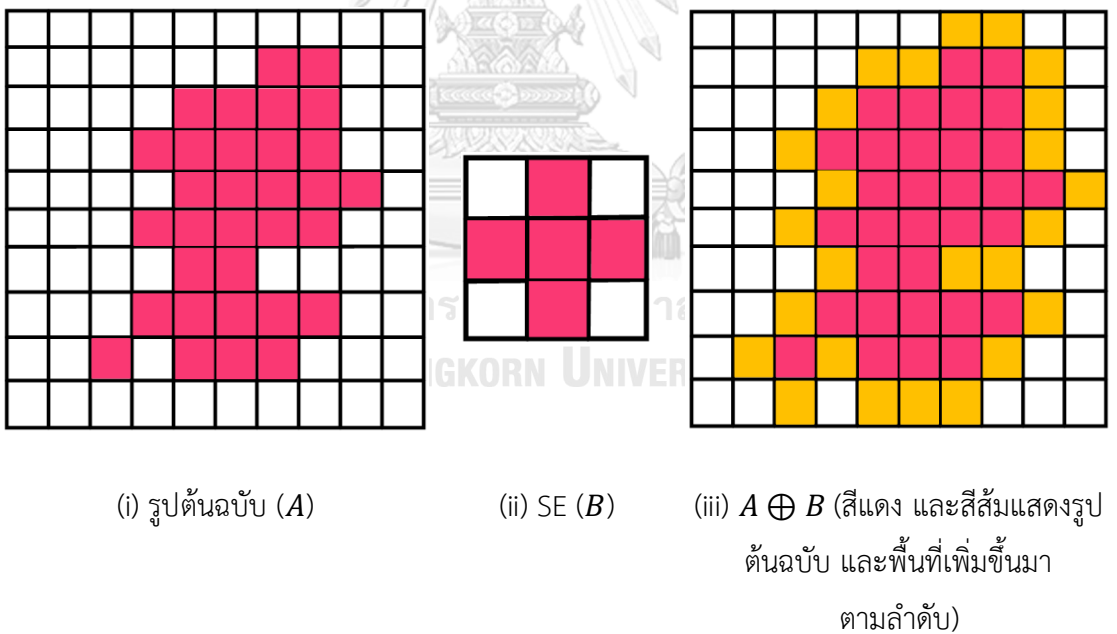
ผลลัพธ์ของตัวดำเนินการขยายขนาดเป็นการทำลายส่วนเว้าแหว่งและรูเล็กๆด้วยการถมด้วยรูปร่าง SE ดังแสดงในรูปที่ 2-8

จากตัวดำเนินการกัดกร่อนและตัวดำเนินการขยายขนาดนี้เราสามารถนำมาเรียงประกอบกันเพื่อตัดส่วนเว้าแหว่งออกจากวัตถุ โดยการนำภาพไบนารีมาผ่านตัวดำเนินการกัดกร่อน ตามด้วยตัว

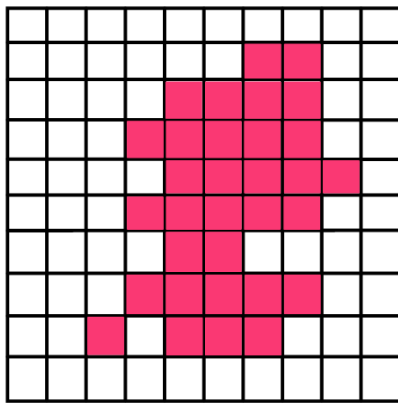
ดำเนินการขยายขนาดที่มี SE ตัวเดียวกันเรียกกระบวนการนี้ว่าการเปิด (Opening) ซึ่งมีลักษณะเหมือนการนำ SE เข้าไปลากตามขอบด้านในของวัตถุและได้ผลลัพธ์เป็นขอบ SE



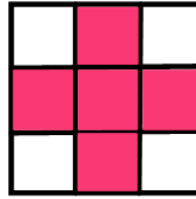
รูปที่ 2-7 การตัดส่วนเว้าแหว่งด้วยตัวดำเนินการกัดกร่อน



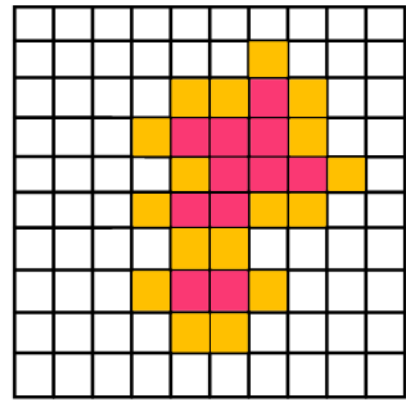
รูปที่ 2-8 การถมส่วนเว้าแหว่งด้วยตัวดำเนินการขยายขนาด



(i) รูปต้นฉบับ (A)

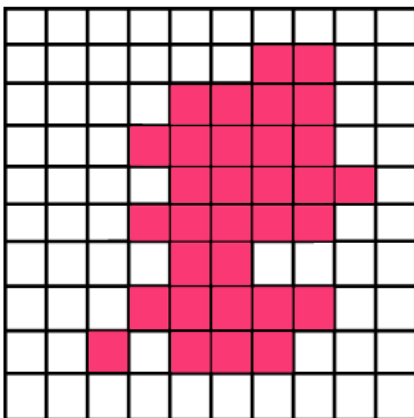


(ii) SE (B)

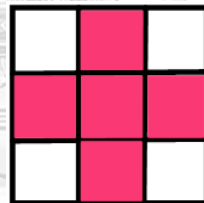


(iii) ผลลัพธ์การเปิด (สีแดง และสีส้ม แสดงพื้นที่ที่เหลืออยู่ และพื้นที่ที่ถูกตัดไปตามลำดับ)

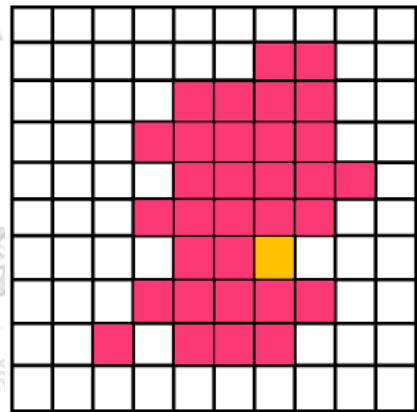
รูปที่ 2-9 ผลการตัดส่วนเว้าแหว่งด้วยการเปิด



(i) รูปต้นฉบับ (A)



(ii) SE (B)



(iii) ผลลัพธ์การปิด (สีแดง และสีส้ม แสดงรูปต้นฉบับ และพื้นที่เพิ่มขึ้นมาตามลำดับ)

รูปที่ 2-10 ผลการถมส่วนเว้าแหว่งและรูด้วยการปิด

หากสลับให้ใช้ตัวดำเนินการขยายขนาดก่อนตัวดำเนินการกัดกร่อนแล้วจะเป็นการถมรูก่อนตัดส่วนที่เว้าแหว่งไป เรียกกระบวนการนี้ว่าการปิด (Closing) ซึ่งมีลักษณะเหมือนการนำ SE เข้าไปลากตามขอบด้านนอกวัตถุและได้ผลลัพธ์เป็นขอบ SE แทน

ผลลัพธ์ของการเปิดและการปิดสำหรับการทำลายส่วนเว้าแหว่งแสดงไว้ในรูปที่ 2-9 และ รูปที่ 2-10 ตามลำดับ การนำสัจฐานวิทยาของภาพมาประยุกต์ใช้กับภาพระดับสีเทาจะเปลี่ยนนิยาม

จากตำแหน่งไปเป็นระดับความสว่างแทน กล่าวคือผลของการกัดกร่อนที่พิกเซลตำแหน่ง (x, y) ได้เป็นความสว่างที่ต่ำที่สุดของภาพภายใน SE ที่มีจุดศูนย์กลางอยู่ที่ (x, y) และการขยายขนาดได้เป็นความสว่างสูงสุดภายในบริเวณ SE

เนื่องจากสัจฐานวิทยาของภาพระดับสีเทาจะปรับในเรื่องของความสว่าง (ไม่ใช่รูปร่าง) ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้เพื่อปรับความต่าง (Contrast) หาขอบวัตถุ รวมถึงหาค่าขีดเริ่มเปลี่ยนได้ ดังเช่น วงจรกรองแบบหมวกสูง (Top-hat filter)

วงจรกรองแบบหมวกสูง (Top-hat filter) แยกองค์ประกอบและรายละเอียดเล็กๆ จากรูปภาพที่มีพื้นหน้า (Foreground) สว่างออกจากพื้นหลัง (Background) สีเข้มเพื่อแก้ไขปัญหาการส่องสว่างที่ไม่สม่ำเสมอ ตามสมการที่ (12)

$$T_{hat}(f) = f - (f \circ b) \quad (12)$$

เมื่อ $T_{hat}(f)$ คือ ผลลัพธ์ของวงจรกรองแบบหมวกสูง (Top-hat filter) เป็นของภาพระดับสีเทา (Gray scale) f

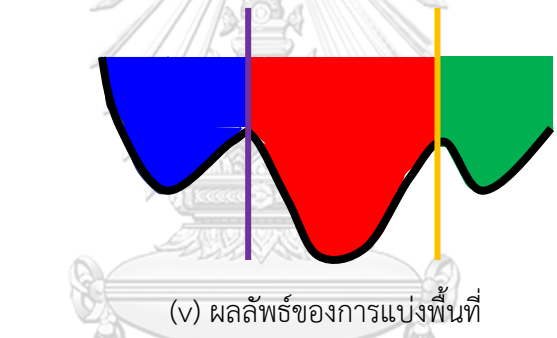
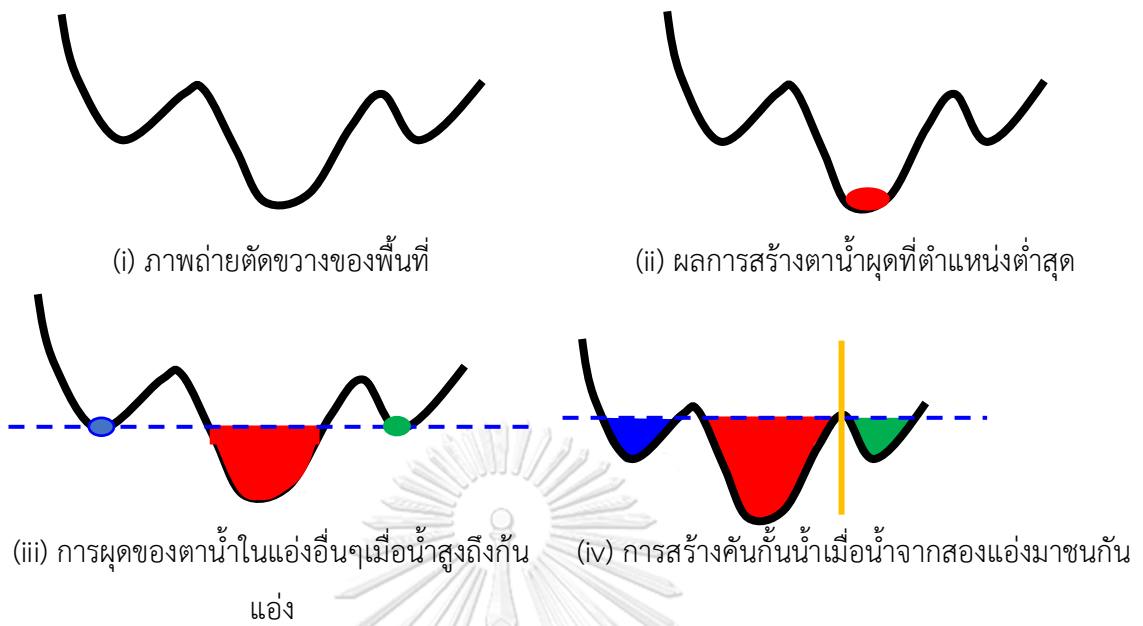
\circ คือกระบวนการเปิด (Opening)

b คือองค์ประกอบโครงสร้าง (Structure element, SE) ของภาพระดับสีเทา f

2.4.7 ขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ (Watershed algorithm) [24]

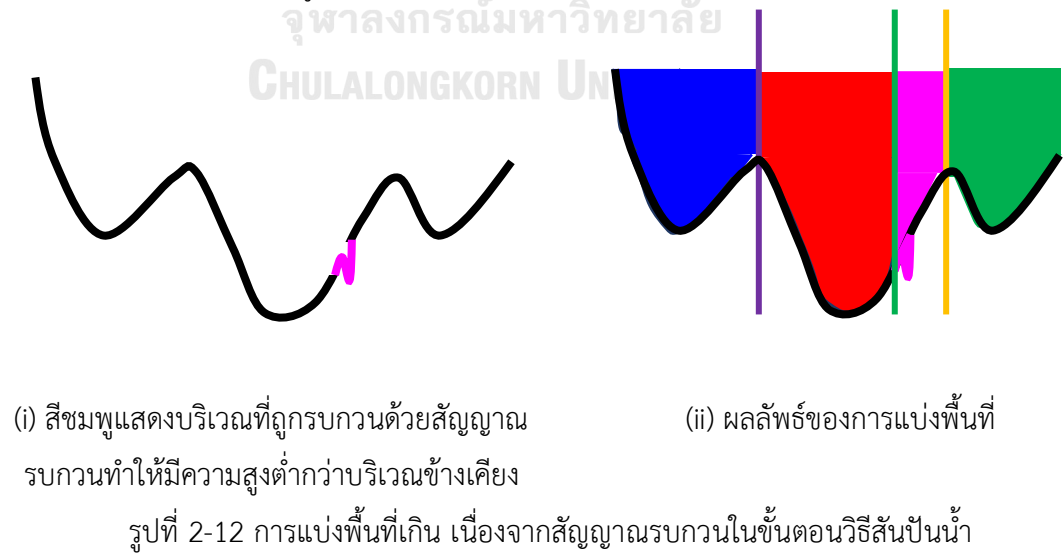
ขั้นตอนวิธีสันปันน้ำเป็นการแบ่งพื้นที่ภาพโดยพิจารณาความเข้มหรือขนาดของข้อมูลในแต่ละจุดภาพเป็นค่าความสูงของพื้นที่ และแบ่งพื้นที่เสมือนเป็นแอ่งน้ำที่มีสันแอ่งแยกกัน รูปที่ 2-11 แสดงการแบ่งภาพด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ เริ่มจากเราพิจารณาให้แกนนั่งในรูปที่ 2-11.(i) เป็นค่าที่ใช้แบ่งภาพ โดยเรามองค่านี้เป็นความสูงของพื้นที่ และเริ่มแบ่งพื้นที่ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. สร้างตาน้ำผุดขึ้นที่ตำแหน่งต่ำสุดของภาพแล้วให้น้ำไหลเพิ่มขึ้นมา ดังแสดงน้ำที่ผุดมาเป็นสีแดงในรูปที่ 2-11.(ii)
2. เมื่อน้ำมีระดับสูงถึงตำแหน่งต่ำสุดของแอ่งอื่นแล้วให้สร้างตาน้ำผุดขึ้นที่แอ่งอื่นด้วย ดังตำแหน่งสีเขียวและสีน้ำเงินในรูปที่ 2-11.(iii)
3. เพิ่มระดับน้ำที่เกิดจากตาน้ำสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงินจนกระทั่งน้ำที่เกิดจากตาน้ำต่างแหล่งมาชนกัน และสร้างคันกั้นน้ำขึ้นมาเพื่อไม่ให้น้ำจากตาน้ำต่างแหล่งมาปะปนกันดังในรูปที่ 2-11.(iv)



รูปที่ 2-11 การแบ่งพื้นที่ด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



4. ทำขั้นตอนที่ 3 ไปเรื่อยๆจนระดับน้ำสูงถึงจุดสูงสุดของภาพ และได้พื้นที่ที่แบ่งเป็นพื้นที่น้ำ ล้นจากตาน้ำแต่ละตา ดังในรูปที่ 2-11.(v) แบ่งภาพออกเป็นสามบริเวณคือสีแดง สีเขียวและ สีน้ำเงิน

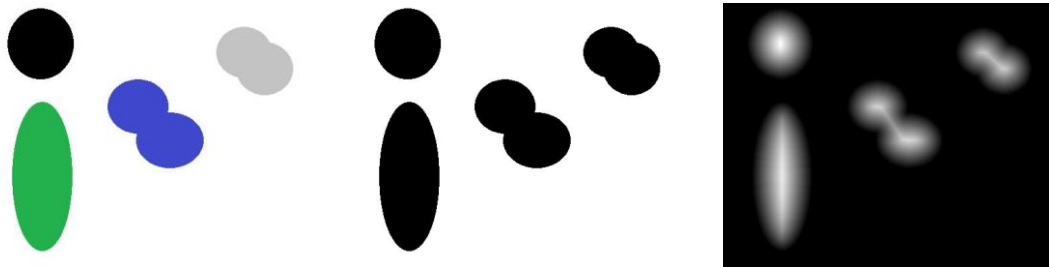
การแบ่งภาพแบบนี้มีปัญหาเรื่องการแบ่งเกิน (Oversegmentation) เนื่องจากสัญญาณรบกวนเป็นแอ่งขนาดเล็ก (รูปที่ 2-12.(i)) เมื่อสร้างตาน้ำสีแดงที่ตำแหน่งต่ำสุดและเพิ่มระดับน้ำไปจนถึงตำแหน่งต่ำสุดของแอ่งใกล้เคียง แต่แอ่งสัญญาณรบกวน (สีชมพู) มีขนาดเล็กและความสูงต่ำ ดังนั้นระดับน้ำจากตาน้ำสีชมพูจึงชนกับตาน้ำสีแดงได้เร็วขึ้นทำให้เกิดคั่นกันน้ำบริเวณนี้ส่งผลให้ผลลัพธ์การแบ่งพื้นที่กลายเป็นสี่บริเวณดังในรูปที่ 2-12.(ii) ดังนั้นเราจึงนิยมทำให้สัญญาณรบกวนเรียบก่อนใช้ขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ

การแบ่งพื้นที่ในภาพด้วยขั้นตอนสันปันน้ำทำได้ง่ายและนิยมใช้ร่วมกับการแปลงระยะทางเมื่อกำหนดให้ภาพที่แสดงวัตถุและส่วนเติมเต็มของภาพคือ A และ A^c ตามลำดับแล้ว เราสามารถสรุปขั้นตอนการแบ่งวัตถุร่วมกับกรรมวิธีสันปันน้ำได้ดังนี้

1. คำนวณหาระยะระหว่างแต่ละตำแหน่งในภาพกับพื้นที่หลังที่ใกล้ที่สุดด้วยการแปลงระยะทางกับ A^c และเรียกผลลัพธ์นี้ว่า D_A
2. นำ D_A ไปผ่านการแปลงแบบ H-maxima เพื่อลดปัญหาเรื่องการแบ่งพื้นที่เกิน และกำหนดค่าของ D_A ที่ตำแหน่งที่เป็นค่าสูงสุดเฉพาะพื้นที่ (Local maxima) หลังการแปลง H-maxima เป็นค่าสูงที่สุดในภาพ
3. แบ่งพื้นที่ในภาพด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำโดยอ้างอิงค่าความสูงจาก $-D_A$ (เปลี่ยนเครื่องหมายของ D_A จากบวกเป็นลบด้วยการคูณ -1 เพื่อให้พื้นที่หลังมีความสูงมากที่สุด ในภาพ

รูปที่ 2-13 แสดงผลของการแบ่งพื้นที่ในภาพด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำร่วมกับการแปลงระยะทาง เมื่อในภาพมีวัตถุจำนวน 6 ชิ้น โดยมีวัตถุรูปวงกลมติดกันอยู่สองบริเวณดังแสดงด้วยสีน้ำเงิน และสีเทา (รูปที่ 2-13.(i)) การแบ่งพื้นที่เริ่มจากการแปลงระยะทางกับส่วนเติมเต็มของภาพไบนารี (A^c ในรูปที่ 2-13.(ii)) ได้ผลลัพธ์เป็นรูปที่ 2-13.(iii) ที่มีตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณ (Local maxima) อยู่บริเวณกึ่งกลางวัตถุ ดังแสดงด้วยสีแดงในรูปที่ 2-13.(iv) สังเกตได้ว่ามีจุดสูงสุดมากกว่าจำนวนวัตถุในภาพ โดยกลุ่มวัตถุสีน้ำเงินซึ่งประกอบด้วย 2 วัตถุมีตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณสามตำแหน่งส่งผลให้หากเราไม่ลดจำนวนจุดสูงสุดด้วยการแปลงแบบ H-maxima แล้วผลลัพธ์การแบ่ง

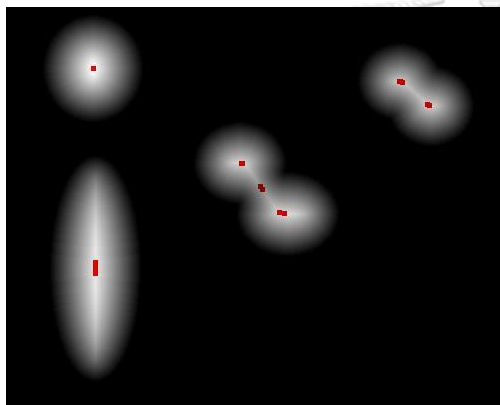
พื้นที่จะได้เป็น 9 พื้นที่แทนที่จะเป็น 6 พื้นที่ (แทนวัตถุ 6 ชนิด) ดังในรูปที่ 2-13.(v) แต่เมื่อเราเพิ่มการแปลงแบบ H-maxima เข้าไปในขั้นตอนที่ 2 เพื่อลดจำนวนจุดสูงสุดดังในรูปที่ 2-13.(vi) แล้วจะได้ผลลัพธ์การแบ่งที่สอดคล้องกับวัตถุดังในรูปที่ 2-13.(vii)



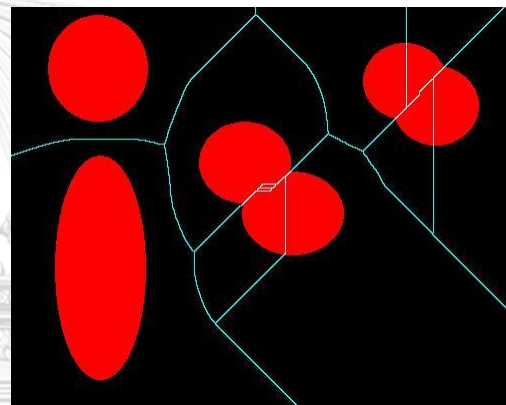
(i) ภาพต้นฉบับ

(ii) A^C

(iii) ผลการแปลงระยะทางของ

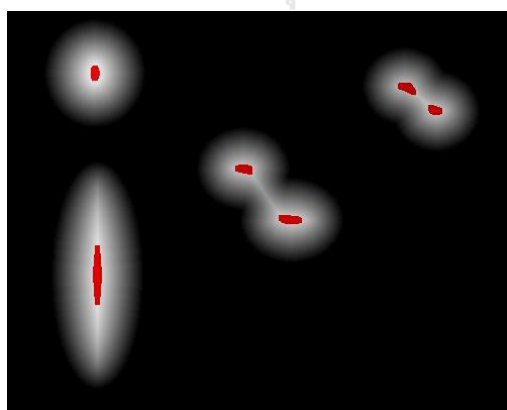
 $A^C(D_A)$ 

(iv) สีแดงแสดงตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณ

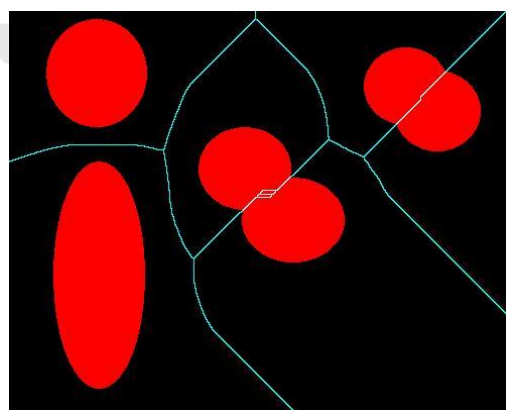


(v) ผลการแบ่งพื้นที่โดยไม่ทำการแปลงแบบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย H-maxima



(vi) สีแดงแสดงตำแหน่งที่ตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณหลังการแปลงแบบ H-maxima



(vii) ผลการแบ่งพื้นที่เมื่อมีการแปลงแบบ H-maxima

รูปที่ 2-13 การแบ่งวัตถุในภาพไบนารีด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำร่วมกับการแปลงระยะทาง

จากผลลัพธ์ในรูปที่ 2-13 เรายังสังเกตเห็นว่าในการแบ่งพื้นที่ด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำสามารถแบ่งวัตถุที่ติดออกจากกันได้โดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลรูปร่างของวัตถุ เนื่องจากความเว้าแหว่งของขอบทำให้เกิดค่าสูงสุดเฉพาะบริเวณมากกว่าหนึ่งตำแหน่งในวัตถุ ดังกลุ่มวัตถุสีน้ำเงินและสีแดงจะได้ตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณมากกว่า 1 ตำแหน่ง ขณะที่วัตถุที่มีความราบเรียบดังเช่นวัตถุสีดำและสีเขียวจะมีตำแหน่งสูงสุดเพียงตำแหน่งเดียว ดังแสดงด้วยจุดสีแดงในรูปที่ 2-13.(iv) และ รูปที่ 2-13.(vi)



บทที่ 3 กรรมวิธีที่นำเสนอ

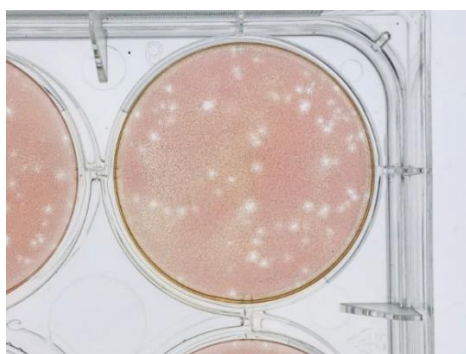
ในบทนี้เราจะเริ่มจากศึกษาลักษณะของรูปถ่ายหลุมในงานเพาะเชื้อที่ไม่มีการควบคุมปริมาณแสง และนำลักษณะเหล่านี้ไปออกแบบกรรมวิธีตามลักษณะที่แสดงไว้ในหัวข้อต่อไป และจบด้วยการปรับวิธีที่นำเสนอไปใช้กับ PFU ขนาดใหญ่และสีย้อมเป็น Crystal violet

3.1 ลักษณะข้อมูล

ภาพในงานวิจัยนี้คือหลุม (Well) ภายในงานเพาะเลี้ยง โดยหนึ่งภาพจะมีเพียงหนึ่งหลุม และขอบหลุมชิดกับขอบภาพ ภาพหลุมนี้ถ่ายด้วยกล้องที่ไม่เจาะจงชนิด ดังนั้นอาจเป็นภาพจากโทรศัพท์เคลื่อนที่ หรือแท็บเล็ตก็ได้ และไม่ควบคุมแสงส่งผลให้ PFU และพื้นหลังแตกต่างกันไม่มากนักและพื้นหลังมีความไม่ราบเรียบมากกว่าภาพที่ปรากฏต่อนักเทคนิคในการนับ PFU เนื่องจากความละเอียดของกล้อง ดังแสดงในรูปที่ 3-1

เมื่อวิเคราะห์เพิ่มเติมไปที่ภาพที่ได้จากกล้องทั่วไปแล้ว เราสามารถสรุปลักษณะของภาพจากกล้องทั่วไปที่มาเป็นอินพุตของกรรมวิธีที่นำเสนอได้ดังนี้

1. พื้นหลังไม่ราบเรียบ มีจุดเล็กสีขาวปะปนกับสีชมพู ซึ่งจุดเล็กสีขาวนี้มีลักษณะคล้ายกับ PFU แต่มีขนาดเล็กกว่า
2. ขอบหลุมมีสีเหลืองปะปน จากผลกระทบของแสงภายนอก
3. ถึงแม้ไวรัสจะถูกเพาะในสภาพเดียวกัน แต่ขนาด และความคมชัดของขอบ PFU แต่ละตัวไม่เท่ากันทั้งยังไม่จำเป็นต้องเป็นวงกลม ดัง PFU ภายในวงกลมสีเขียว ในรูปที่ 3-2
4. PFU มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ดังนั้นการรวมของ PFU จะเกิดเป็นพื้นที่ขนาดใหญ่ที่ไม่เว้นแหว่งก็ได้ ดังตัวอย่างในวงกลมสีน้ำเงินในรูปที่ 3-2

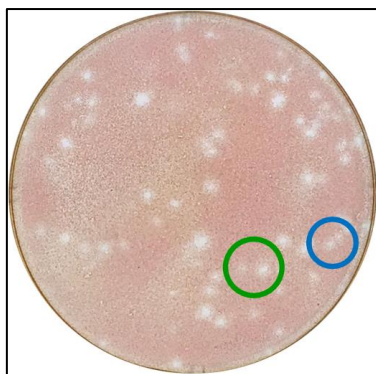


(i) ภาพหลุมที่ผู้ปฏิบัติการใช้



(ii) ภาพหลุมที่ได้จากกล้องทั่วไป

รูปที่ 3-1 ตัวอย่างของภาพหลุมที่ผู้ปฏิบัติการใช้นับ และที่ได้จากกล้องทั่วไป



รูปที่ 3-2 ลักษณะของภาพหลุมที่ได้จากกล้องทั่วไป

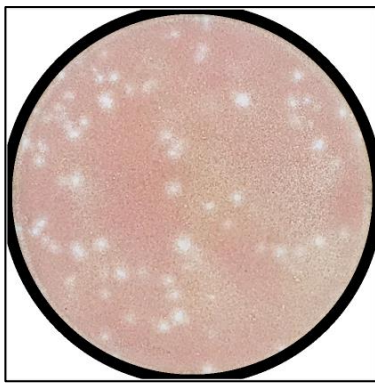
จากการวิเคราะห์ข้างต้น เราจึงได้ออกแบบกรรมวิธีเพื่อลดทอนผลกระทบของลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. สีขาวของพื้นหลังถึงจะมีปริมาณมากแต่มีขนาดเล็กกว่า PFU ดังนั้นใช้ตัวกรองแบบเกาส์เซียนเพื่อทำให้พื้นหลังราบเรียบขึ้น
2. ในกรณีที่ตัวอย่างประกอบด้วย PFU ขนาดเล็กต้องเลือกใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน และปริภูมิสีที่แตกต่างกันในการแยก PFU บริเวณกลางและขอบหลุม เนื่องจากความชัดเจนของ PFU ทั้งสองบริเวณมีลักษณะแตกต่างกัน ไม่สามารถใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบเดียวกันได้ แต่หากเป็น PFU ขนาดใหญ่แล้ว PFU มีลักษณะต่างจากพื้นหลังอย่างเห็นได้ชัดทุกบริเวณ จึงไม่ต้องแยกคิดค่าขีดเริ่มเปลี่ยนเป็นสองบริเวณ
3. ใช้กรรมวิธีที่ต่างกันในการแยก PFU ขนาดเล็กและใหญ่ที่ติดกัน เนื่องจากความว่างจะเห็นชัดเจนเฉพาะการติดกันของ PFU ขนาดใหญ่

3.2 การกำหนดขอบเขตของขนาดวินโดว์ของค่าขีดเริ่มเปลี่ยนปรับตัวได้

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้เพื่อค้นหาพื้นที่ PFU และกำหนดให้การหาขนาดวินโดว์แบบอัตโนมัติ (หัวข้อที่ 3.3.1) ค้นหาขนาดที่อยู่ภายในช่วง 15-99 พิกเซลเท่านั้น เนื่องจากผลการวิเคราะห์ผลกระทบของขนาดวินโดว์กับการค้นหาพื้นที่ PFU ดังนี้

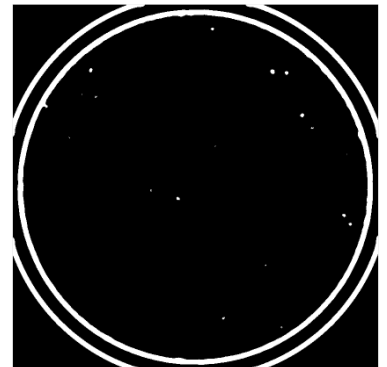
1. กรณี PFU ขนาดเล็ก (เช่น ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)) หากขนาดวินโดว์เล็กเกินไป จะไม่พบ PFU ภายในภาพ และหากพบจะได้เป็นพื้นที่ขนาดเล็ก ขณะที่หากขนาดใหญ่เกินไปจะเกิดการรวมกันของ PFU ทั้งยังพบ PFU ได้น้อยลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3.3
2. กรณี PFU ขนาดใหญ่ (เช่น ไวรัสไข้ปวดข้อยุ่งลาย (Chikungunya virus)) เมื่อขนาดวินโดว์เพิ่มขึ้น พื้นที่ PFU จะเชื่อมต่อกัน หากขนาดวินโดว์ลดลง PFU จะแบ่งออกเป็นขอบและรูภายใน (รูปที่ 3-4)



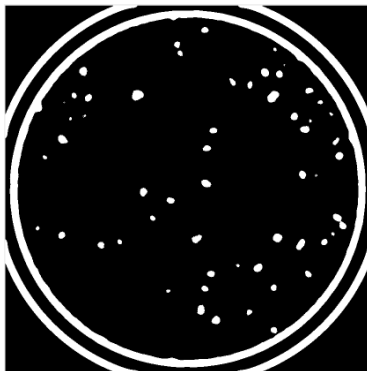
(i) ภาพต้นฉบับ



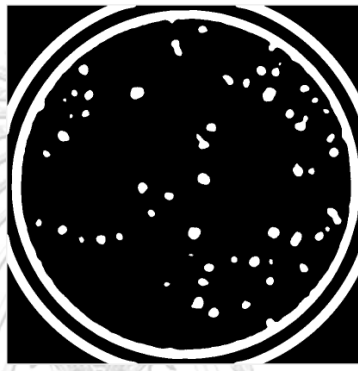
(ii) Window size = [9 9]



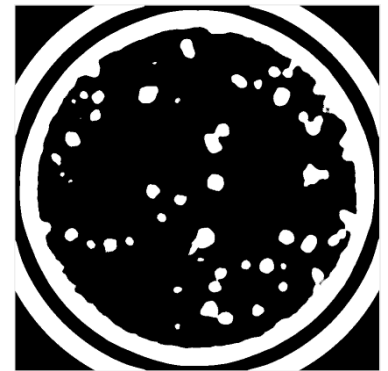
(iii) Window size = [21 21]



(iv) Window size = [33 33]



(v) Window size = [45 45]



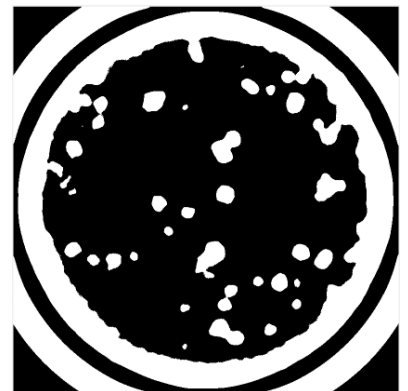
(vi) Window size = [95 95]



(vii) Window size = [107 107]

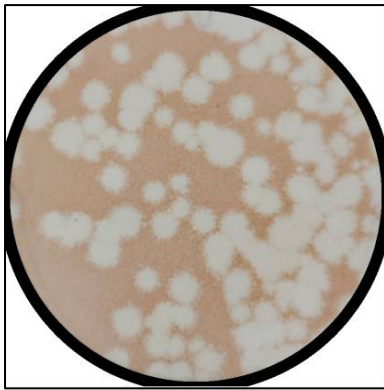


(viii) Window size = [119 119]

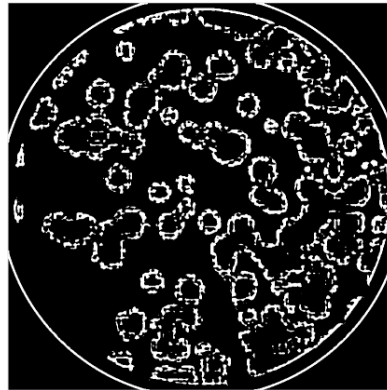


(ix) Window size = [131 131]

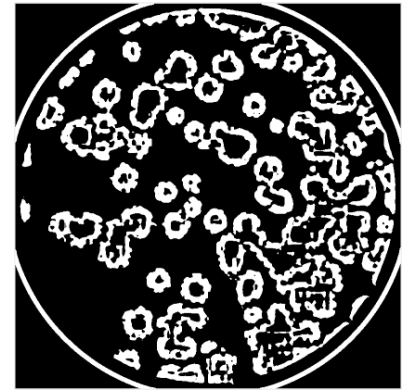
รูปที่ 3-3 ภาพการหาพื้นที่ PFU จากการเพิ่มขึ้นของขนาดวินโดว์ของไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)



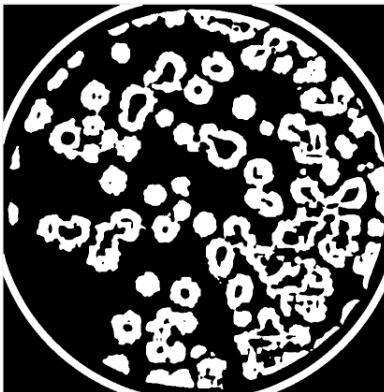
(i) ภาพต้นฉบับ



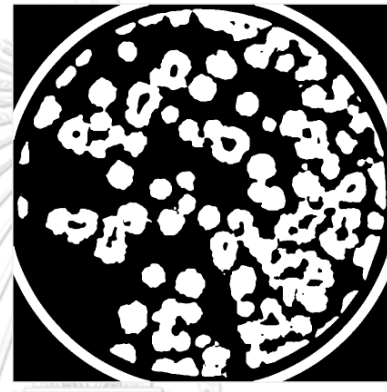
(ii) Window size = [9 9]



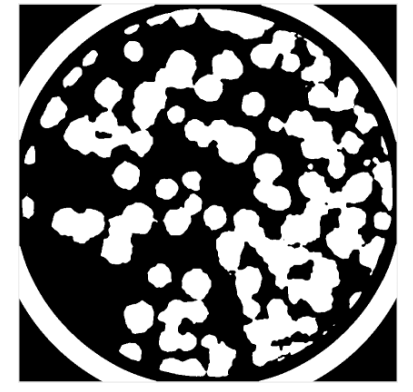
(iii) Window size = [21 21]



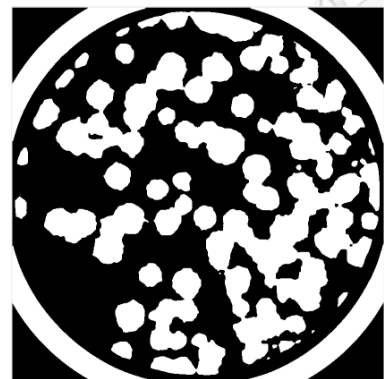
(iv) Window size = [33 33]



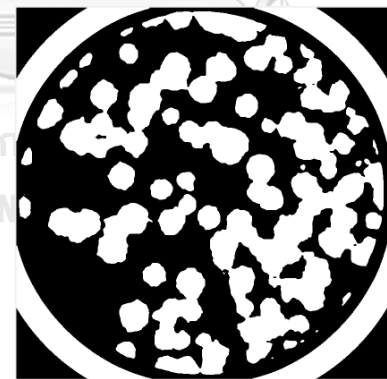
(v) Window size = [45 45]



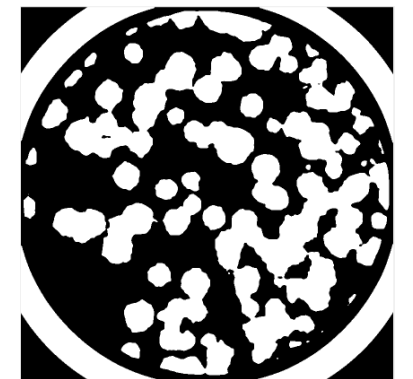
(vi) Window size = [95 95]



(vi) Window size = [107 107]



(vii) Window size = [119 119]



(viii) Window size = [131 131]

รูปที่ 3-4 ภาพการหาพื้นที่ PFU จากการเพิ่มขึ้นของขนาดวินโดว์ของไวรัสไขว่ปัดข้อยุ่งลาย (Chikungunya virus)

3.3 กรรมวิธีการนับ PFU ขนาดเล็ก

กรรมวิธีนับ PFU แบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักคือ

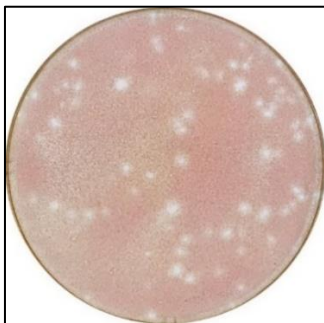
1. การแบ่งพื้นที่เป็นบริเวณขอบหลุมและกลางหลุม

2. การปรับปรุงรูปร่าง PFU และค้นหา PFU บริเวณขอบหลุม
3. การแยก PFU ที่ติดกัน โดยเริ่มจากการแยก PFU ขนาดใหญ่ และตามด้วยขนาดเล็ก

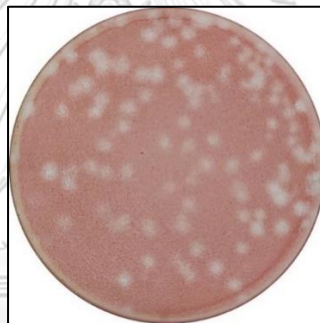
3.3.1 การแบ่งพื้นที่หลุม

ถึงแม้เราไม่ได้กำหนดสภาพแวดล้อมในการถ่ายรูป แต่ขอบหลุมต้องติดกับขอบภาพทั้งสี่ด้าน ดังรูปที่ 3-5 (ซึ่งอาจจะเกิดจากการถ่ายรูปเอาแต่หลุม หรือใช้โปรแกรมมาตัดภาพก็ได้) และแบ่งพื้นที่ภายในหลุมเป็นกลางหลุมและขอบหลุมดังขั้นตอนต่อไปนี้

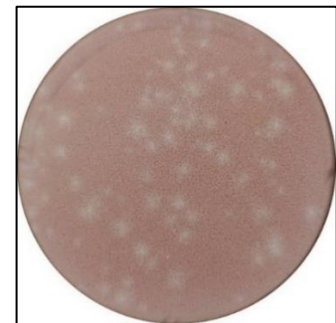
1. ปรับขนาดของภาพที่เข้ามาให้เท่ากับ 830×830 จุดภาพ สังเกตว่าไวรัสแต่ละชนิดมีขนาดและความชัดแตกต่างกัน
2. หลุมในจานเพาะเชื้อเป็นรูปร่างกลมและขอบหลุมติดกับขอบภาพ ดังนั้นพื้นที่หลุมจึงอยู่ภายในวงกลมที่มีจุดศูนย์กลางอยู่กลางภาพและรัศมีเท่ากับ 415 จุดภาพ เราจึงสร้างวงกลมสีดำหนาแสดงขอบหลุม และให้พื้นที่นอกหลุมเป็นสีขาว (รูปที่ 3-6.(i))



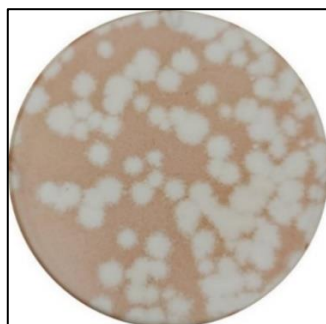
(i) ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)



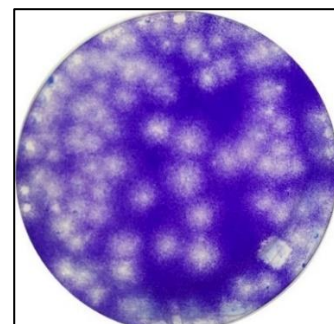
(ii) ไวรัสไข้สมองอักเสบ (Japanese Encephalitis virus)



(iii) ไวรัสไข้ซิกา (Zika virus)



(iv) ไวรัสไข้ปวดข้อขุยงลาย (Chikungunya virus)

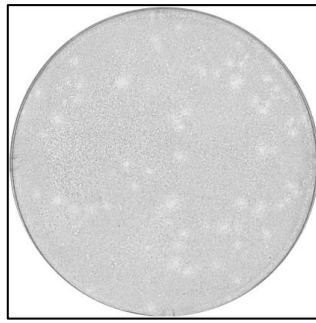


(v) ไวรัสโคโรนา (Coronavirus)

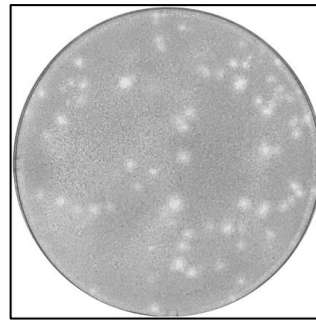
รูปที่ 3-5 ตัวอย่างภาพ PFU ที่ใช้ในการทดลอง



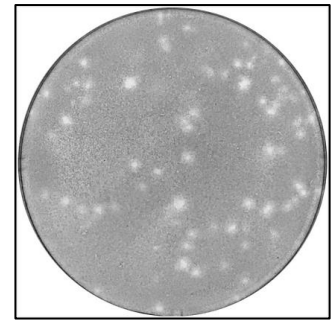
(i) รูปภาพต้นฉบับที่กำหนดให้พื้นที่นอกหลุมเป็นสีขาว



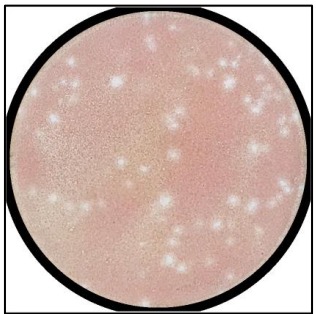
(ii) ข้อมูลในช่องสัญญาณ R (สีแดง) ของปริภูมิสี RGB



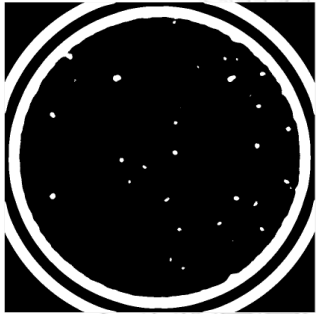
(iii) ข้อมูลในช่องสัญญาณ G (สีเขียว) ของปริภูมิสี RGB



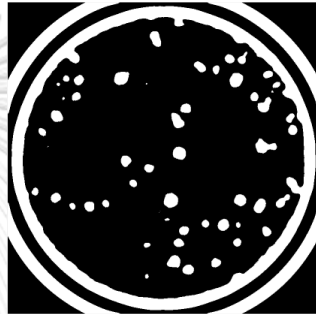
(iv) ข้อมูลในช่องสัญญาณ B (สีน้ำเงิน) ของปริภูมิสี RGB



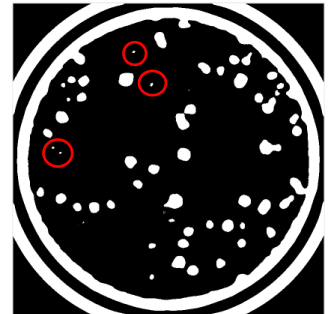
(v) รูปต้นฉบับเมื่อเพิ่มกรอบสีดำกับภาพ (i)



(vi) ภาพเมื่อใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้กับภาพ (ii)

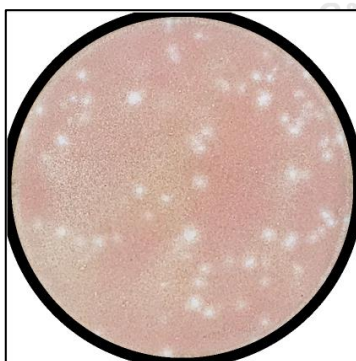


(vii) ภาพเมื่อใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้กับภาพ (iii)

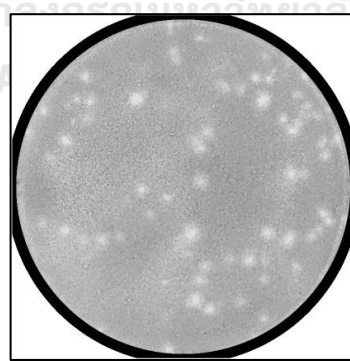


(viii) ภาพเมื่อใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้กับภาพ (iv)

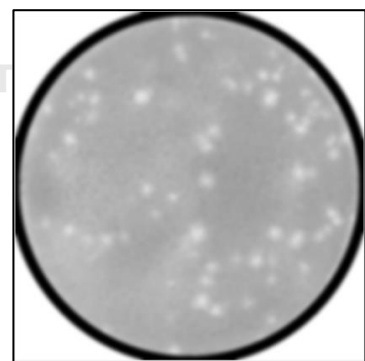
รูปที่ 3-6 ข้อมูลภาพในแต่ละช่องสัญญาณและผลการแบ่งภาพเมื่อใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้ (วงกลมสีแดงแสดงสัญญาณรบกวน)



(i) รูปที่เพิ่มวงกลมสีดำและจัดให้บริเวณนอกหลุมเป็นสีขาว



(ii) ข้อมูลในช่องสัญญาณ G (สีเขียว) ของปริภูมิสี RGB



(iii) ผลการเพิ่มความราบเรียบด้วยวงจรรองเกาส์เซียน

รูปที่ 3-7 การกรองข้อมูลรูปภาพ

3. เพิ่มความราบเรียบของพื้นหลังในงานเพาะเชื้อ โดยนำข้อมูลในช่องสัญญาณ G (สีเขียว) ในปริภูมิสี RGB ไปผ่านวงจรรองแบบเกาส์เซียนขนาด 5×5 จุดภาพ ทั้งนี้เราเลือกใช้ข้อมูล

ในช่องสัญญาณ G เนื่องจากเป็นช่องสัญญาณที่มีสัญญาณรบกวนน้อยกว่าช่องสัญญาณ B [25] ทั้งการค้นหา PFU ในช่องสัญญาณ G ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดดังตัวอย่างในรูปที่ 3-6 ซึ่งข้อมูลในช่องสัญญาณ R มีพื้นหลังที่สว่างใกล้เคียงกับ PFU ทำให้หาพื้นที่ PFU ไม่ครบ ขณะที่การค้นหาในช่องสัญญาณ B ได้พื้นหลังมาปะปน รูปที่ 3-6 แสดงผลลัพธ์ของการกรองเพื่อเพิ่มความราบเรียบของพื้นหลังแสดงในรูปที่ 3-7

4. ใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัว (หัวข้อที่ 3.2) กับผลลัพธ์ในขั้นตอนที่ 3. การใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวในขั้นตอนนี้จะใช้กับภาพ PFU ขนาดเล็ก โดยกำหนดให้ค่าความไววงที่เท่ากับ 0.55 แต่ขนาดวินโดว์เปลี่ยนแปลงตามลักษณะ PFU ซึ่งจะถูกคำนวณอัตโนมัติ ดังนี้
ค่าเริ่มต้น i แสดงลำดับข้อมูล กำหนดให้เท่ากับ 1

n แสดงขนาดวินโดว์ กำหนดให้เท่ากับ 15 โดยที่ $n = 13 + 2i$

1. หาบริเวณ PFU และพื้นหลังของหลุมด้วยวินโดว์ขนาด $n \times n$ จุดภาพ
2. คำนวณค่าเฉลี่ยความเข้มของ PFU และพื้นหลังของหลุมในช่องสัญญาณ R G และ B
3. คำนวณผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มของ PFU และของพื้นหลังในช่องสัญญาณ R G และ B
4. คำนวณผลรวมของผลต่างช่องสัญญาณทั้งสาม เรียกค่านีว่า d_i
5. เพิ่ม n ไป 2 และ i ไป 1
6. ถ้า $n < 100$ กลับไปขั้นตอนที่ 1
7. ให้ $T_d = \left[\max_i d_i \right]$ และหาตำแหน่งของ d_i ที่มากกว่าหรือเท่ากับ T_d
ตำแหน่งแรก เรียกตำแหน่งนี้ว่า ตำแหน่ง k สำหรับค่าตัวอย่างในรูปที่ 3-8 จะได้ว่า $T_d = 32$ และ $k = 12$
8. คำนวณค่าเฉลี่ยของ d_i เมื่อ $k \leq i \leq 43$ (กรอบสีเขียว ในรูปที่ 3-8) เรียกค่าเฉลี่ยนี้ว่า d_{avg}
9. $k_{opt} = \left| \arg \min_i (d_i - d_{avg}) \right|$ ซึ่งในรูปที่ 3-8 ได้ $k_{opt} = 28$
10. ผลลัพธ์คือขนาดวินโดว์ที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ $(13 + 2k_{opt}) \times (13 + 2k_{opt})$
จุดภาพ

ข้อสังเกต ไม่ว่าค่าขีดเริ่มเปลี่ยนจะหาจากข้อมูลในปริภูมิใดก็ตาม การคำนวณขนาดวินโดว์จะใช้ขั้นตอนเหมือนกันและอ้างอิงจากปริภูมิสี RGB เท่านั้น

จากการคำนวณโดยใช้ค่าความสว่างในรูปที่ 3-7.(iii) ได้ผลออกมาดังรูปที่ 3-8 และได้วินโดว์ขนาดที่เหมาะสมที่สุดคือ 69×69 พิกเซล

5. ผลลัพธ์ของการค้นหา PFU ในขั้นตอนที่ 4 จะเกิดวงกลมซ้อนอยู่ในขอบจางดังรูปที่ 3-9.(i) กำหนดให้พื้นที่ระหว่างวงกลมสองวงเป็นพื้นที่ขอบหลุมและ PFU ภายในวงกลมวงเล็กคือ PFU บริเวณกลางหลุม (รูปที่ 3-9.(ii))

3.3.2 การปรับปรุงรูปร่าง PFU และค้นหา PFU บริเวณขอบหลุม

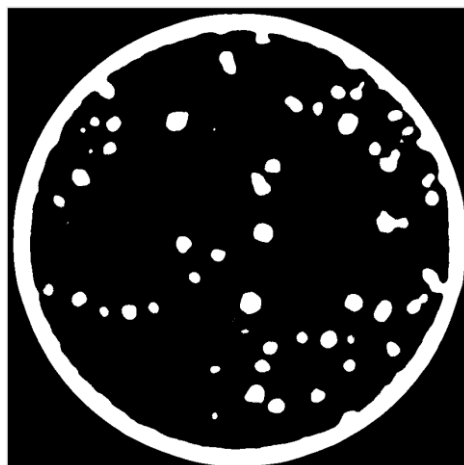
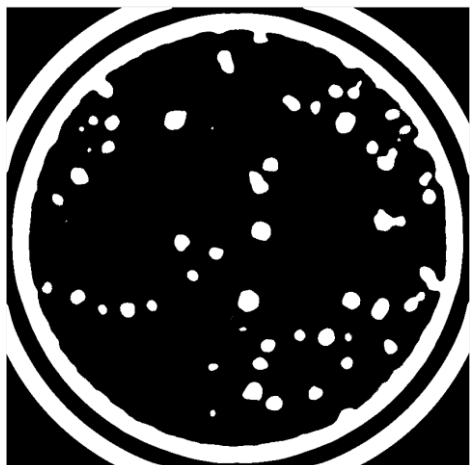
ในขั้นตอนแบ่งพื้นที่หลุมนั้น เราได้ PFU บริเวณกลางหลุมมาด้วย จึงไม่มีความจำเป็นที่จะสร้างกรรมวิธีแยก PFU บริเวณนี้ออกจากพื้นหลังเพิ่มเติม PFU บริเวณขอบหลุมมีความแตกต่างกับพื้นหลังไม่มากเท่ากลางหลุม รวมทั้งอาจมีสีเหลืองมาปะปนทำให้การแบ่งพื้นที่ด้วยค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวกับช่องสัญญาณ G เพียงช่องสัญญาณเดียวได้ผลไม่ดี เราจึงเลือกการสร้างค่าใหม่จากฟังก์ชันเชิงเส้นของช่องสัญญาณ X และ Z ในปริภูมิ CIE-XYZ เนื่องจากสามารถนำฟังก์ชันเชิงเส้นของสองช่องสัญญาณนี้มาคัดแยก PFU จากพื้นหลังได้ง่าย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า PFU มีค่าในช่องสัญญาณ Z (รูปที่ 3-10.(i)) สูงขณะที่ช่องสัญญาณ X มีความสว่างต่ำทุกบริเวณ ดังนั้นหากลบพื้นที่พื้นหลังด้วยการนำภาพจากช่องสัญญาณ Z ไปหักล้างกับข้อมูลในช่องสัญญาณ X (รูปที่ 3-10.(iii)) จะได้ PFU เป็นหลัก

หลังจากกระบวนการเน้น PFU แล้ว เราใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัว (หัวข้อที่ 3.2) ที่กำหนดขนาดด้วยกรรมวิธีเดียวกันกับขั้นตอนที่ 4 ของการแบ่งพื้นที่หลุมในหัวข้อ 3.3.1 และให้ความไวเท่ากับ 0.55 วินโดว์ที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าการแบ่งพื้นที่หลุม เช่นในกรณีนี้ได้เป็น 77×77 พิกเซล (ในหัวข้อ 3.2.1) เนื่องจาก PFU บริเวณขอบมีความชัดเจนน้อยกว่า และได้ผลลัพธ์ดังแสดงในรูปที่ 3-10.(iv) ซึ่งจะเห็นว่าไม่สามารถค้นหา PFU ได้ถูกต้องบริเวณกลางจาง แต่ถ้าพิจารณาเฉพาะบริเวณขอบหลุม (รูปที่ 3-10.(v)) จะได้ PFU ที่สมบูรณ์แต่มีขนาดเล็กกว่าบริเวณกลางหลุม จากนั้นนำ PFU กลางหลุมรวมกับขอบหลุมและปรับปรุงรูปร่างด้วยกรรมวิธีเปิด (Opening) (รูปที่ 3-10.(vi))

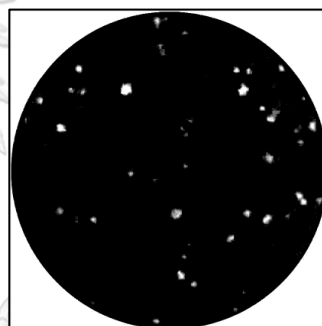
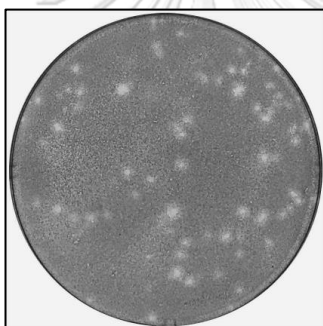
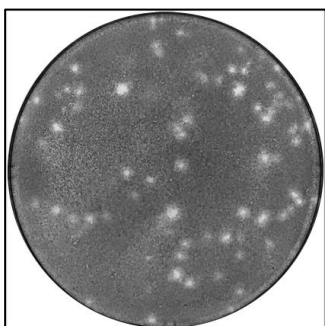
Index (i)	Window size (n)	Average for each channel of foreground			Average for each channel of background			The sum of RGB channel differences between foreground & background (d_i)	
		Red	Green	Blue	Red	Green	Blue		
1	15	205.164948	185.0124967	172.8282793	208.1071419	175.4562189	164.0919494	15.35041385	
2	17	205.2089991	184.9099315	172.7796263	208.1226169	175.4038162	164.0416604	15.3304634	
3	19	205.3296472	184.9550641	172.9339652	208.1313472	175.3496553	163.9852716	15.75240237	
4	21	205.6347801	185.323453	173.5409168	208.1272549	175.2725922	163.8964922	17.20281061	
5	23	206.1135724	185.9375879	174.4692335	208.1086	175.167294	163.7714033	19.47309644	
6	25	206.7551395	186.7561248	175.6830528	208.0724647	175.0257452	163.5992995	22.49680779	
7	27	207.4722659	187.6751083	177.0234123	208.0203933	174.8528137	163.3868483	25.91073134	
8	29	207.982186	188.2419638	177.8858842	207.9759037	174.6955394	163.194695	28.24389589	
9	31	208.3420789	188.570493	178.4346847	207.9381457	174.5511482	163.0179321	29.84003059	
10	33	208.5972455	188.7415878	178.7705822	207.9061341	174.4238984	162.8612624	30.91812064	
11	35	208.7928391	188.7981633	178.9521717	207.8769591	174.3064242	162.71626	31.6435308	
12	37	208.9219196	188.7695074	179.0228466	207.8536683	174.206863	162.5913682	32.06237414	$T_d = 32$
13	39	209.02616	188.699936	179.031536	207.8315409	174.1109948	162.4711607	32.34393563	k
14	41	209.0805116	188.5669965	178.9588828	207.8153945	174.0300329	162.3678432	32.39312031	
15	43	209.1227561	188.4083558	178.8518848	207.8004625	173.9573365	162.2735046	32.35169313	
16	45	209.1519494	188.2398892	178.7321364	207.7871714	173.8905819	162.1850848	32.26113677	
17	47	209.1692401	188.0467798	178.5798976	207.7757141	173.8332135	162.1070739	32.07991597	
18	49	209.1767261	187.8493751	178.419466	207.7659032	173.7811676	162.0347653	31.8637312	
19	51	209.1723245	187.6353673	178.2348394	207.7580543	173.7339694	161.967994	31.58251354	
20	53	209.1753647	187.4358425	178.0620388	207.7491151	173.6896033	161.9045732	31.32995438	
21	55	209.1633108	187.2141265	177.863713	207.7427054	173.6486122	161.8441258	31.00570697	
22	57	209.1655858	187.0167511	177.6905177	207.7339393	173.6095875	161.7858279	30.74349983	
23	59	209.1579504	186.809006	177.4997273	207.7268925	173.5723726	161.7299251	30.4374935	
24	61	209.1387791	186.5941673	177.3014046	207.7226526	173.5413463	161.680377	30.08997507	
25	63	209.1213003	186.3818851	177.1005738	207.7182912	173.5126859	161.6340768	29.73870539	
26	65	209.104797	186.1804294	176.9091938	207.7140704	173.4856157	161.5897456	29.4049884	
27	67	209.0922878	185.9828271	176.7181083	207.7089478	173.4588534	161.5460937	29.07932831	
28	69	209.0742363	185.7870814	176.5290624	207.7053539	173.4342972	161.5044701	28.74625899	
29	71	209.0616623	185.6033641	176.3517845	207.7004969	173.408331	161.4611456	28.44683742	$k_{opt} = 28$
30	73	209.0477579	185.4165755	176.1698683	207.695735	173.3819711	161.4168634	28.13963216	
31	75	209.0305318	185.2347661	175.9934366	207.6923263	173.359305	161.3765582	27.83054498	
32	77	209.0098591	185.0547707	175.814556	207.6901561	173.3390886	161.3398545	27.51008673	
33	79	208.9954469	184.8837287	175.6423337	207.6862573	173.31675	161.3011201	27.21738178	
34	81	208.9800632	184.7190003	175.4746785	207.6825105	173.2920851	161.2598253	26.93932119	
35	83	208.9657963	184.5604546	175.3104021	207.6788742	173.2699586	161.2223891	26.665431	
36	85	208.9542184	184.4176632	175.1645252	207.6752595	173.2509419	161.1887122	26.42149329	
37	87	208.9326161	184.2721422	175.0150974	207.6749085	173.2342878	161.157556	26.15310347	
38	89	208.9161662	184.1294775	174.8700214	207.6731721	173.2184997	161.1267509	25.89724237	
39	91	208.9031281	184.0009546	174.7386157	207.6707518	173.2018971	161.0957837	25.67426582	
40	93	208.8875251	183.8688639	174.6007665	207.6691661	173.1864391	161.0664653	25.43508503	
41	95	208.8726578	183.7428701	174.4684029	207.6674992	173.1703206	161.0366438	25.20946715	
42	97	208.8614976	183.6254928	174.3454696	207.6648314	173.1537729	161.0064005	25.00745521	
43	99	208.8416605	183.5001175	174.2147115	207.6654917	173.142222	160.981283	24.76749282	
								$d_{avg} = 28.90091162$	

รูปที่ 3-8 การหาขนาดวินโดว์ของภาพไวรัสไข้เลือดออก

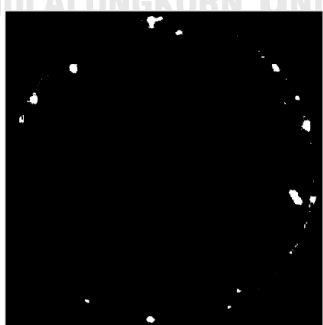
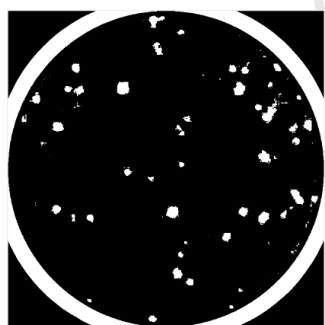


(i) ผลการแบ่งภาพด้วยการใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้ (ii) พื้นที่กลางหลุมคือพื้นที่ข้างในวงกลมและพื้นที่ขอบหลุมคือพื้นที่ภายในวงกลมเล็ก

รูปที่ 3-9 กระบวนการแบ่งพื้นที่หลุมเป็นบริเวณกลาง และขอบหลุม



(i) ข้อมูลในช่องสัญญาณ Z (ii) ข้อมูลในช่องสัญญาณ X (iii) ผลต่างระหว่างภาพใน (i) และ (ii) เมื่อเพิ่มความสว่างเป็น 10 เท่า



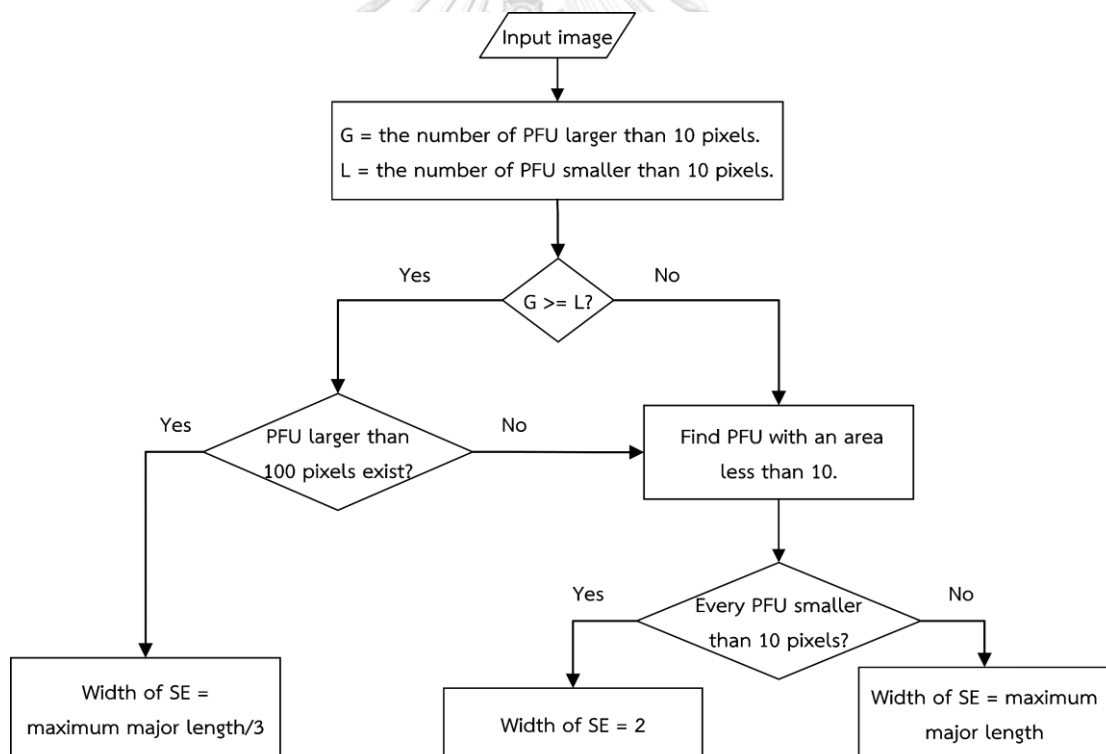
(iv) ผลการแบ่งภาพด้วยการใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้ (v) ผลการแบ่งภาพเฉพาะบริเวณขอบหลุม (vi) ผลการปรับปรุงพื้นที่ PFU ภายในหลุม

รูปที่ 3-10 การแยก PFU บริเวณขอบหลุมและปรับปรุงพื้นที่ภายในหลุม

3.3.3 การปรับปรุงรูปร่าง PFU

การปรับปรุงรูปร่าง PFU ภายในหลุมอาศัยกรรมวิธีเปิด (Opening) เมื่อ SE เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีขนาดขึ้นกับการกระจายตัวของขนาด PFU ว่าเป็นขนาดเล็กหรือใหญ่เพียงใด โดยขั้นตอนการหาขนาด SE รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส แสดงดังรูปที่ 3.11 และมีรายละเอียดดังนี้

1. หากมีจำนวน PFU ใหญ่กว่า 10 พิกเซลมากกว่าหรือเท่ากับจำนวน PFU ที่เล็กกว่า 10 พิกเซล และมี PFU ขนาดใหญ่กว่า 100 พิกเซล กำหนดความกว้างของ SE เท่ากับ $1/3$ เท่าของความยาวแกนหลักของ PFU ที่ยาวที่สุด
2. หากทุก PFU ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 พิกเซล กำหนดให้ความกว้างของ SE เท่ากับ 2
3. หากไม่ตรงกับกรณีในข้อ 1. และ 2. ให้ความกว้างของ SE เท่ากับความยาวของแกนหลักที่ยาวที่สุดของ PFU ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 พิกเซล



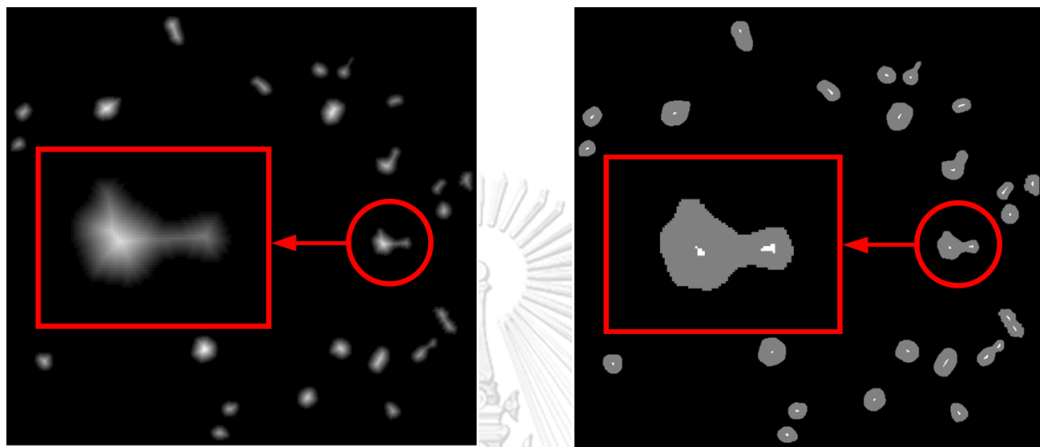
รูปที่ 3-11 การหาความกว้างของ SE รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส

3.3.4 การแยก PFU ที่ติดกัน

PFU ขนาดใหญ่ติดกันจะมีความเว้าแหว่งปรากฏ แต่หากเป็น PFU ขนาดเล็กแล้วจะปรากฏเป็นส่วนใหญ่ที่ยื่นออกมาที่ความเว้าแหว่งอาจจะไม่ชัดเจน เราจึงแบ่งกรรมวิธีแยก PFU ออกเป็นสองขั้นตอนคือ แยก PFU ขนาดใหญ่ก่อนแล้วแยก PFU ขนาดเล็กจากเกณฑ์พื้นที่ ขั้นตอนการแยก PFU สามารถสรุปได้ดังนี้

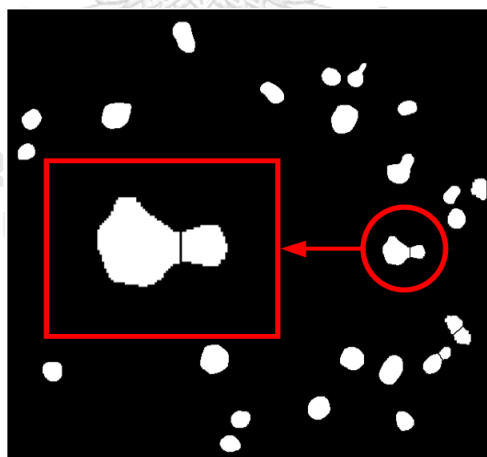
1. แยกพื้นที่ PFU ที่ได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 เป็นสองประเภทตามเส้นผ่านศูนย์กลางของเฟรท กล่าวคือ พื้นที่ PFU ขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเฟรทที่ยาวที่สุดของ PFU ทั้งหมดในภาพ และขนาดเล็กสำหรับพื้นที่ที่เหลือ
2. คำนวณค่าเฉลี่ยความสว่างต่ำสุดของพื้นที่ PFU ใช้การแบ่งพื้นที่ภาพด้วยขั้นตอนวิธีสันปันน้ำ ร่วมกับการแปลงระยะทางกับ PFU ขนาดใหญ่ เมื่อกำหนดให้พื้นที่ที่มีความสว่างต่างจากพื้นที่โดยรอบน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของความสว่างที่น้อยที่สุดของ PFU ทั้งหมดในภาพคือ สัญญาณรบกวน และปรับความสูงของสัญญาณรบกวนให้เท่ากับพื้นที่รอบๆ (ตัวอย่างของการแบ่งภาพแสดงในรูปที่ 3-12)
3. นำผลการแบ่งพื้นที่ PFU ขนาดใหญ่รวมกับพื้นที่ขนาดเล็ก (ที่ยังไม่ได้ถูกแบ่ง)
4. ใช้การแปลงระยะทางกับผลลัพธ์ในขั้นตอนที่ 3. เพื่อหาระยะระหว่างจุดภาพในวัตถุกับพื้นที่หลังที่ใกล้ที่สุด
5. คำนวณหาความยาวแกนรอง (Minor axis length) ของ PFU ที่ยาวที่สุดและเรียกค่านี้ว่า r โดยพิจารณาว่า PFU ภายในภาพมีขนาดไม่เกินวงกลมรัศมี $0.5r$
6. สร้างวงกลมจากจุดศูนย์กลางของภาพการแปลงระยะทางขั้นตอนที่ 3 รัศมี $0.5r$ รอบระยะสูงสุดของผลลัพธ์ในขั้นตอนที่ 4 และนำวงกลมนี้ไปผ่านตัวดำเนินการ AND กับผลลัพธ์ในขั้นตอนที่ 3 เพื่อค้นหาพื้นที่ PFU ที่ค้นพบแล้วในภาพ (ตัวอย่างผลลัพธ์แสดงในรูปที่ 3-14.(i)) เนื่องจาก PFU บางชนิดมีขนาดใหญ่หรือติดกันจนกลายเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ ซึ่งการ AND ทีละ PFU หากทำรวมกันทีเดียวจะทำให้เกิดการแบ่งเป็นพื้นที่ใหม่ขึ้น ดังรูปที่ 3.13 ดังนั้นจะต้องดำเนินการทีละ PFU
7. ค้นหา PFU ขนาดเล็กและเป็นส่วนที่ยื่นออกมาติดกับ PFU อื่นๆด้วยขั้นตอนดังนี้
 - a. หาผลต่างระหว่างผลลัพธ์ในขั้นตอนที่ 5. และ 8. (รูปที่ 3-14.(ii)) ผลลัพธ์นี้ประกอบด้วย PFU ขนาดเล็ก และสัญญาณรบกวน

- b. กำจัดสัญญาณรบกวนในภาพด้วยกรรมวิธีเปิดที่ใช้ SE รูปสี่เหลี่ยมขนาด 3×3 (รูปที่ 3-14.(iii))
8. รวมผลลัพธ์ที่ได้ในขั้นตอนที่ 6. และ 7. เข้าด้วยกันเป็น PFU ที่มีในภาพทั้งหมด (รูปที่ 3-14.(iv-v))



(i) ผลลัพธ์ของการแปลงระยะทาง

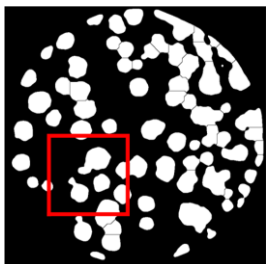
(ii) ตำแหน่งสูงสุดเฉพาะบริเวณเมื่อกำหนดให้พื้นที่ต้องมีความสูงต่างจากพื้นที่โดยรอบไม่น้อยกว่าค่าเฉลี่ยของความสว่างที่น้อยที่สุดทั้งหมด



(iii) ผลลัพธ์การแบ่ง PFU ขนาดใหญ่
รูปที่ 3-12 การแยก PFU ขนาดใหญ่ที่ติดกัน



(i) ภาพต้นฉบับ



(ii) PFU ที่มีส่วนที่ยื่น



(iii) ภาพขยายของ (ii)



(iv) ภาพเมื่อขยายจุด

ศูนย์กลางพร้อมกัน

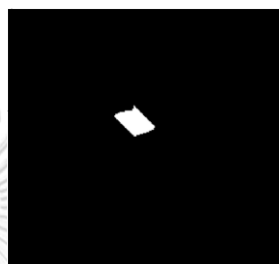


(v) ภาพขยายของ (iv)



(vi) ผลลัพธ์เมื่อทำการ

AND



(vii) ภาพ (iii) หักล้างกับ

(vi)



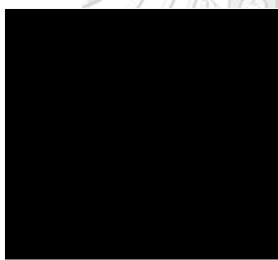
(viii) ภาพเมื่อขยายจุด

ศูนย์กลางทีละพื้นที่



(ix) ผลลัพธ์เมื่อทำการ

AND



(x) ภาพ (iii) เฉพาะพื้นที่

ที่สนใจหักล้างกับ (ix)



(xi) พื้นที่บริเวณอื่น

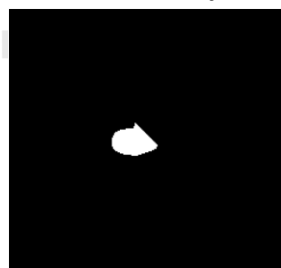


(xii) ภาพเมื่อขยายจุด

ศูนย์กลางทีละพื้นที่

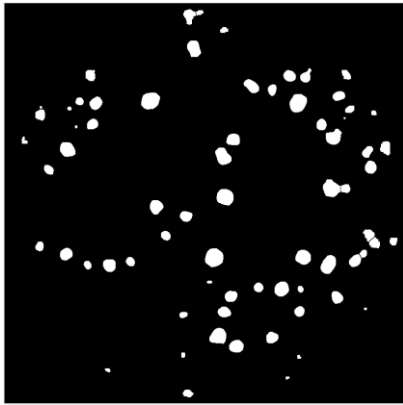


(xiii) ผลลัพธ์เมื่อทำการ AND



(xiv) ภาพ (iii) เฉพาะพื้นที่ที่สนใจหักล้างกับ (xiii)

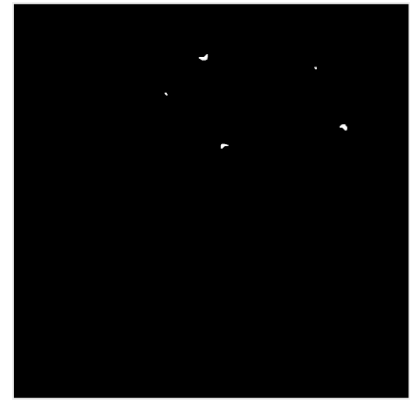
รูปที่ 3-13 การหาพื้นที่บริเวณส่วนที่ยื่นออกมาด้วยการ AND ทีละพื้นที่



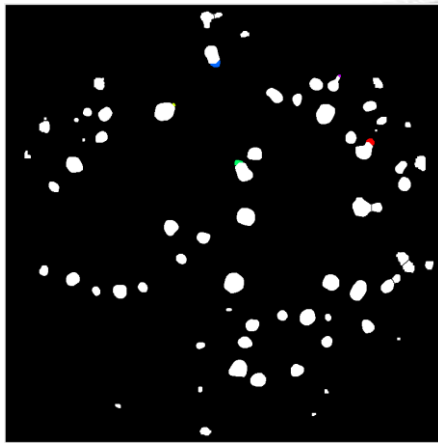
(i) PFU ที่ถูกค้นพบจากขั้นตอนวิธี
สันปันน้ำและการประมาณ PFU ด้วย
วงกลม



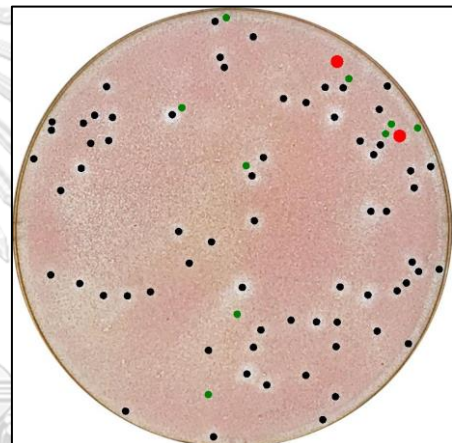
(ii) สัญญาณรบกวนและ PFU ขนาด
เล็กที่มีลักษณะเป็นส่วนที่ยื่นออกมา
ติดกับ PFU ขนาดใหญ่



(iii) ผลการลบสัญญาณรบกวนด้วย
กรรมวิธีเปิด



(iv) PFU ที่ค้นหาได้เมื่อ PFU ขนาดเล็กแสดงเป็นพื้นที่สี
ที่ไม่ใช่สีขาว

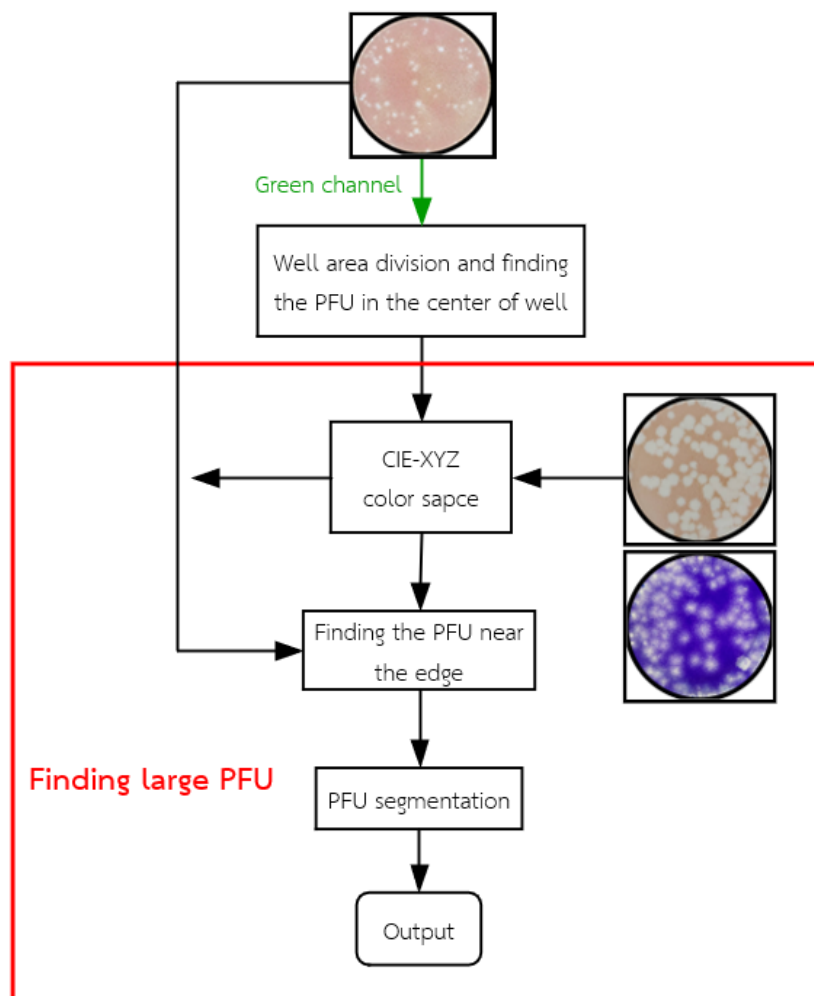


(v) ผลการหา PFU เมื่อเทียบกับภาพต้นฉบับ (สีดำ-
PFU ที่หาเจอ สีแดง-PFU ที่หาไม่เจอ สีเขียว-จุดที่
ไม่ใช่ PFU)

รูปที่ 3-14 การแยก PFU ขนาดเล็กออกจากบริเวณอื่น และรวมเป็นผลการหา PFU ทั้งหมด

3.4 กรรมวิธีการนับ PFU ขนาดใหญ่

PFU ขนาดใหญ่มีความแตกต่างกับพื้นหลังอย่างเห็นได้ชัด ทำให้การเปลี่ยนสีของขอบหลุมไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะของ PFU ดังนั้นเราสามารถตัดขั้นตอนการแบ่งพื้นที่กลางหลุมและขอบหลุมออกไปคงไว้เพียงการกรองด้วยวงจรรองเกาส์เซียน (Gaussian filter) เท่านั้น



รูปที่ 3-15 ความแตกต่างของกระบวนการนับ PFU ขนาดเล็กและขนาดใหญ่

รูปที่ 3-15 เป็นกรรมวิธีการค้นหา PFU ที่มีขนาดเล็ก และภายในกรอบสีแดงเป็นกรรมวิธีการค้นหาพื้นที่ทั้งหมดสำหรับ PFU ขนาดใหญ่ ที่ผ่านการกรองด้วยวงจรงอกแกลสสีเขียวและ PFU ทั้งหมดมาจากค่าขีดเริ่มเปลี่ยนค่าเดียวที่คำนวณจากช่องสัญญาณในปริภูมิ CIE-XYZ ลักษณะของ PFU ขนาดใหญ่ที่แตกต่างจากพื้นหลังอย่างเห็นได้ชัดนี้เป็นลักษณะเดียวกับตัวอย่างที่ถูกย้อมด้วยสี Crystal violet จึงสามารถใช้กรรมวิธีนับ PFU ขนาดใหญ่มานับ PFU ที่ย้อมสี Crystal violet ได้

3.5 การประยุกต์กับตัวอย่างที่ย้อมด้วยสีต่างกัน

ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการมีได้หลายสี โดยแต่ละสีมีตำแหน่งใน CIE-XYZ ที่ต่างกัน ในกรรมวิธีที่นำเสนอใช้วิธีสร้างฟังก์ชันเชิงเส้นกับค่าในแต่ละช่องสัญญาณสีเพื่อทำให้ผลต่างของ PFU สีขาวบนพื้นหลังที่เป็นสีย้อมต่างกันมากที่สุด สังเกตว่าสีขาวเป็นสีที่มีองค์ประกอบของช่องสัญญาณ R G และ B ประมาณเท่าๆ กัน ขณะที่สีย้อมจะมีองค์ประกอบบางช่องสัญญาณสูงและบางช่องต่ำ จึงเลือกใช้ฟังก์ชันเชิงเส้นมาหาผลต่างโดยอ้างอิงจากลักษณะสีย้อมนั้น ฟังก์ชันที่กำหนดเลือกพิจารณา

ช่องสัญญาณที่พื้นฉากหลัง (สีข้อม) มีค่าต่ำและนำภาพมาเพิ่มความสว่างให้ความสว่างของฉากหลังประมาณเท่ากับช่องสัญญาณอื่น ขณะที่ PFU จะสว่างผิดปกติ ดังนั้นเมื่อนำภาพที่เพิ่มความสว่างนี้ไปหักล้างกับช่องสัญญาณอื่นแล้วจะเหลือพื้นที่ PFU เป็นหลัก สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้พิจารณาฟังก์ชันสำหรับสีข้อม 2 สี ดังนี้

1. สี Neutral red มีขนาดขององค์ประกอบสีฟ้าต่ำ ดังรูปที่ 3-16.(i) ส่งผลให้มีค่าในช่องสัญญาณ Z ของปริภูมิ CIE-XYZ ต่ำ ขณะที่ม้องค์ประกอบสีแดงค่อนข้างสูงทำให้รูปในช่องสัญญาณ X ของปริภูมิ CIE-XYZ มีความแตกต่างระหว่าง PFU และพื้นหลังต่ำกว่าช่องสัญญาณอื่น ดังรูปที่ 3-17.(i)-(iv) จึงเขียนฟังก์ชันได้ตามสมการที่ (13)

$$I_{mapped} = \alpha Z - X \quad (13)$$

เมื่อ I_{mapped} คือผลการแปลงภาพสีให้อยู่ในปริภูมิที่ใช้หาค่าขีดเริ่มเปลี่ยน

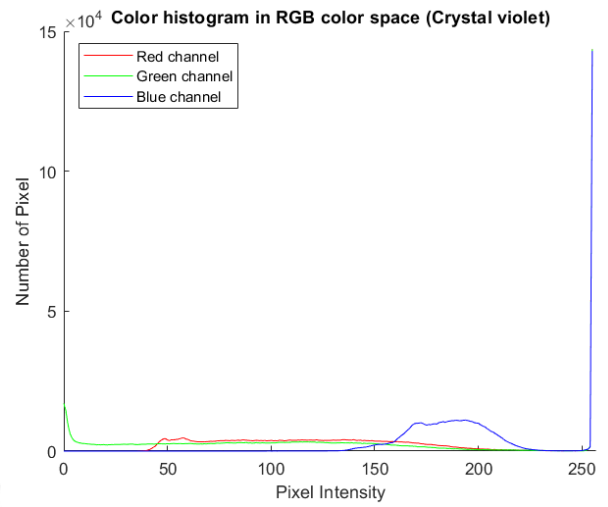
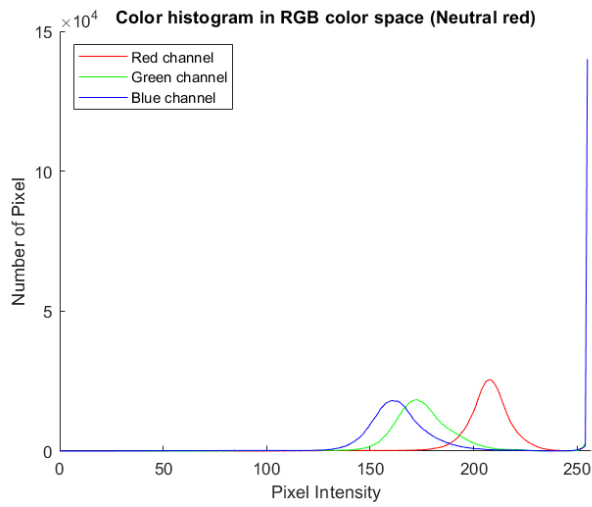
α คือค่าถ่วงน้ำหนักที่ผู้ใช้กำหนด (จากการทดลองพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1-5)

X และ Z คือค่าในช่องสัญญาณ X และ Z ตามลำดับ

2. สี Crystal violet มีขนาดขององค์ประกอบสีฟ้าสูง ดังรูปที่ 3-16.(ii) ส่งผลให้มีค่าในช่องสัญญาณ Y ของปริภูมิ CIE-XYZ ต่ำกว่า PFU มากกว่าช่องสัญญาณอื่น ดังแสดงในรูปที่ 3-17.(v)-(viii) จึงเขียนฟังก์ชันได้ตามสมการที่ (14)

$$I_{mapped} = \alpha Y - X \quad (14)$$

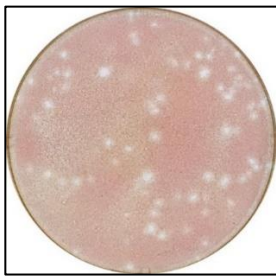
เมื่อ Y คือค่าในช่องสัญญาณ Y และช่วงของ α ที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองเป็น 1-



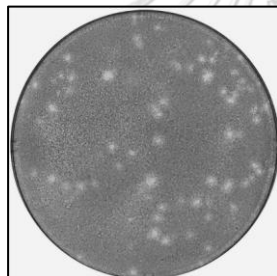
(i) กราฟฮิสโตแกรมในปริภูมิสี R G B ของสีย้อม Neutral red

(ii) กราฟฮิสโตแกรมในปริภูมิสี R G B ของสีย้อม Crystal violet

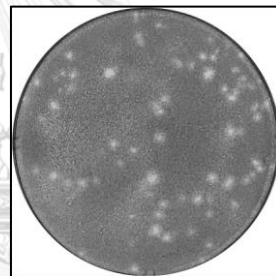
รูปที่ 3-16 กราฟฮิสโตแกรม (Histogram) แสดงค่าของสี R G B



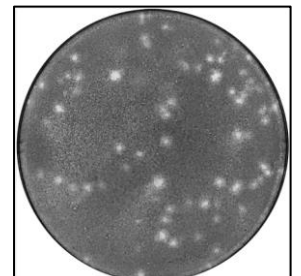
(i) ภาพที่ย้อมด้วยสี Neutral red



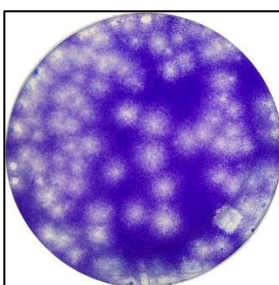
(ii) ข้อมูลช่องสัญญาณ X ของภาพ (i)



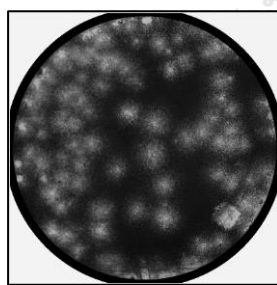
(iii) ข้อมูลช่องสัญญาณ Y ของภาพ (i)



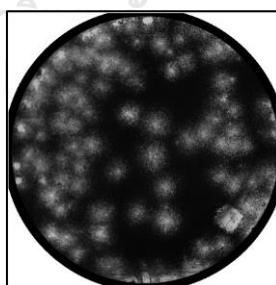
(iv) ข้อมูลช่องสัญญาณ Z ของภาพ (i)



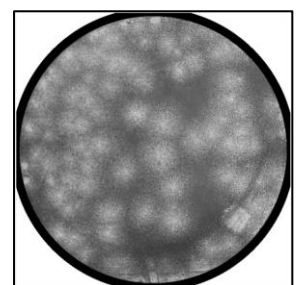
(v) ภาพที่ย้อมด้วยสี Crystal violet



(vi) ข้อมูลช่องสัญญาณ X ของภาพ (v)



(vii) ข้อมูลช่องสัญญาณ Y ของภาพ (v)



(viii) ข้อมูลช่องสัญญาณ Z ของภาพ (v)

รูปที่ 3-17 ลักษณะของสีย้อมและ PFU ในแต่ละช่องสัญญาณของปริภูมิ CIE-XYZ

บทที่ 4 ผลการทดลอง

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เราเปรียบเทียบผลการนับ PFU ระหว่างกรรมวิธีที่นำเสนอกับกรรมวิธีของ Premsattham และคณะ [6] และ Claytor [7] โดยใช้ภาพ PFU ดังต่อไปนี้

1. ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus) ย้อมด้วยสี Neutral red จำนวน 30 รูป
2. ไวรัสไข้สมองอักเสบ (Japanese Encephalitis virus) ย้อมด้วยสี Neutral red จำนวน 30 รูป
3. ไวรัสไข้ซิกา (Zika virus) ย้อมด้วยสี Neutral red จำนวน 30 รูป
4. ไวรัสไข้ปวดข้อชงูลาย (Chikungunya virus) ย้อมด้วยสี Neutral red จำนวน 30 รูป
5. ไวรัสโคโรนา (Coronavirus) ย้อมด้วยสี Crystal violet จำนวน 30 รูป

ภาพที่ใช้ในการทดลองได้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีนมหาวิทยาลัยมหิดล และประเมินประสิทธิภาพด้วยพารามิเตอร์สามตัวดังต่อไปนี้

1. ความแตกต่างระหว่างการนับด้วยมนุษย์และการนับด้วยคอมพิวเตอร์ (Error)
2. ความแม่นยำ (Precision) เมื่อพิจารณาว่า PFU และพื้นที่หลังคือผลบวก (Positive) และผลลบ (Negative) ตามลำดับ
3. ความไว (Sensitivity)

ปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของกรรมวิธีคือความแม่นยำในการดึงพื้นที่ PFU ออกจากพื้นที่หลัง เนื่องจากลักษณะ PFU ในการทดลองนี้แตกต่างจาก PFU ที่ [6, 7] ใช้ ทั้งข้อมูลภาพในวิทยานิพนธ์นี้ไม่มีการควบคุมแสง เราจึงไม่สามารถใช้กรรมวิธีที่นำเสนอได้ทั้งหมด และได้เปลี่ยนขั้นตอนการดึงพื้นที่ และปรับปรุง PFU ดังนี้

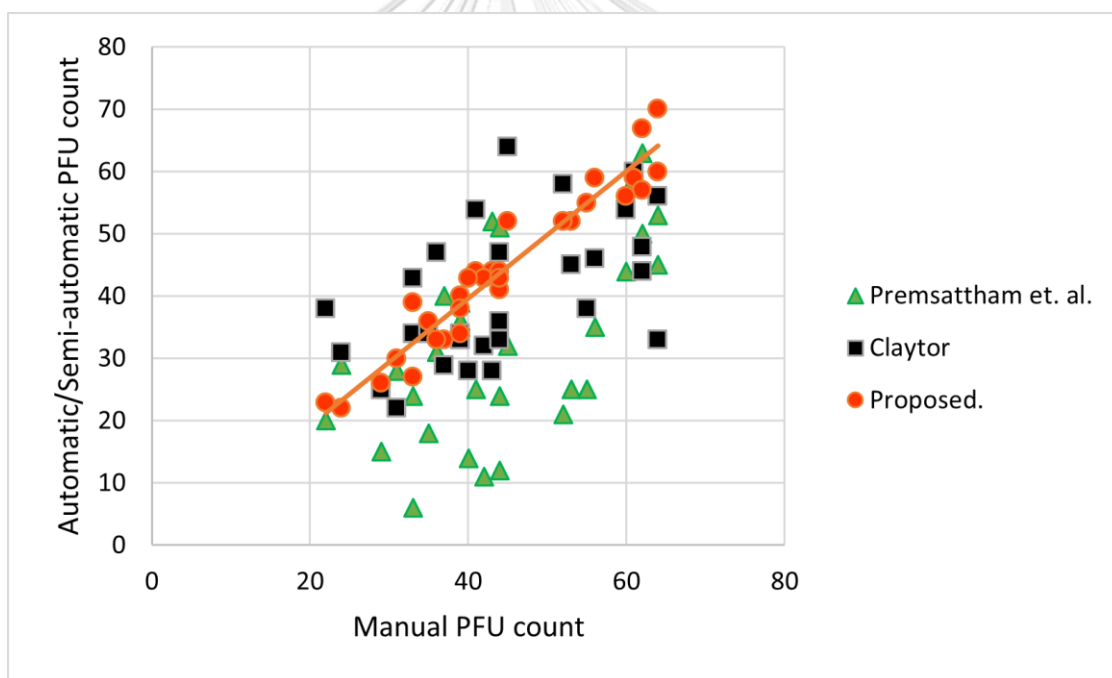
1. วิธีของ Premsattham และคณะ ใช้การปรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนด้วยมือจนได้ผลดีที่สุด และใช้วงจรรองเงาที่ช่วยลดทอนสัญญาณรบกวนโดยปรับขนาดตัวกรองให้เหมาะสม เพราะหากขนาดใหญ่ไปวงจรรองเงาจะทำลาย PFU ขนาดเล็กจากภาพ แต่หากขนาดเล็กเกินไปจะเกิดสัญญาณรบกวนจำนวนมาก จากนั้นปรับปรุงรูปร่างด้วย กระบวนการทางสัณฐานวิทยา (Morphological process)
2. ในวิธีของ Claytor ใช้การปรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนด้วยมือจนได้ผลดีที่สุด และใช้กระบวนการเปิด (Opening) ตามด้วยการปิด (Closing) เพื่อลดขนาดของสัญญาณรบกวน

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1. ประสิทธิภาพของระบบในการนับ PFU ของไวรัสไข้เลือดออกที่ย้อมด้วยสี Neutral red (ตามขอบเขตวิทยานิพนธ์)
2. การนับ PFU ของไวรัสชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไวรัสไข้เลือดออก
3. การนับ PFU ที่ย้อมสี Crystal violet
4. ผลกระทบของพารามิเตอร์ในกรรมวิธีที่น่าเสนอ

4.1 การนับ PFU ของไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)

รูปที่ 4-1 แสดงผลการนับ PFU เมื่อเส้นสีน้ำเงินแสดงกรณีที่ผลการนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน ซึ่งใช้ตัวอย่างรูปทั้งหมด 30 รูป จากกราฟจะเห็นได้ชัดเจนว่ากรรมวิธีที่น่าเสนอ (วงกลมสีแดง) ให้ผลใกล้เคียงกับการนับของผู้เชี่ยวชาญมากที่สุด



รูปที่ 4-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ด้วยผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีแดง สามเหลี่ยมสีเขียว และสี่เหลี่ยมสีดำแสดงผลการนับของกรรมวิธีที่น่าเสนอ กรรมวิธีของ Premsattham และคณะ และกรรมวิธีของ Clayton ตามลำดับ และเส้นตรงสีส้มแสดงตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตาราง 4-1 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่นำเสนอ กรรมวิธีของ Claytor และกรรมวิธีของ Premsattham และคณะ เมื่อสีแดงแสดงค่าที่ดีที่สุด

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ			
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)		
	กรรมวิธีที่นำเสนอ	Claytor	Premsattham และคณะ
Error	6.53	22.96	31.65
Precision = TP/(TP+FP)	92.46	59.38	73.76
Sensitivity = TP/(TP+FN)	91.16	52.93	51.76
Coefficient of determination (R^2)	0.9272	0.301	0.3576


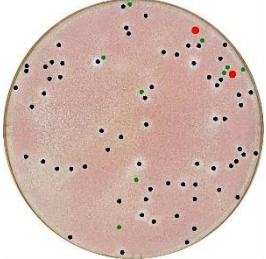

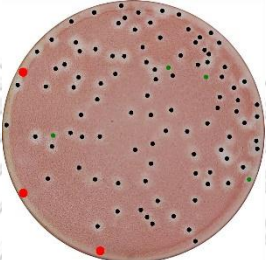

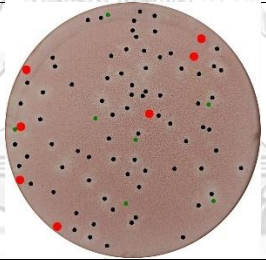
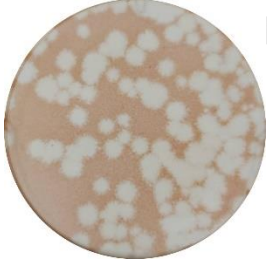
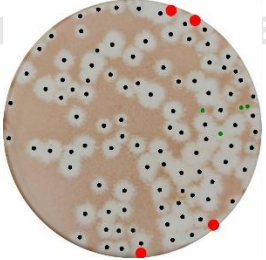
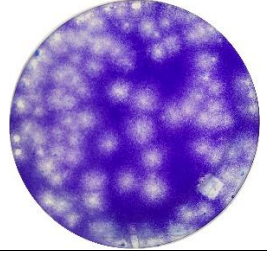
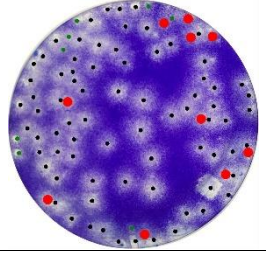
กราฟในรูปที่ 4-1 แสดงเฉพาะจำนวน PFU ที่นับได้ แต่ไม่ได้พิจารณาว่าตำแหน่งของ PFU ที่ค้นพบนั้นเป็น PFU จริงหรือไม่ รวมถึงไม่ได้พิจารณาว่ามีนับขาด หรือเกินในบริเวณใดหรือไม่ เราจึงได้ทำการประเมินความถูกต้องของ PFU ที่ค้นพบด้วยค่าความแม่นยำและความไวได้ผลตามตาราง 4-1 เมื่อ TP และ FP คือตำแหน่ง PFU ที่คอมพิวเตอร์หาได้ถูกต้อง (สอดคล้องกับผู้เชี่ยวชาญ) และผิดตามลำดับ ขณะที่ FN คือตำแหน่งที่คอมพิวเตอร์พิจารณาว่าเป็นพื้นหลัง แต่ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาเป็น PFU

ตาราง 4-1 แสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีที่นำเสนอให้ผลการนับ PFU ถูกต้อง แม่นยำกว่ากรรมวิธีที่นำมาเปรียบเทียบอย่างมีนัยยะทุกกรณี


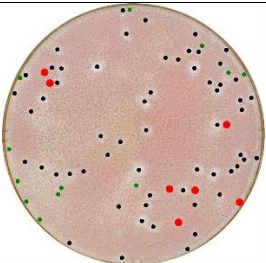

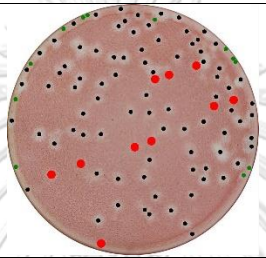

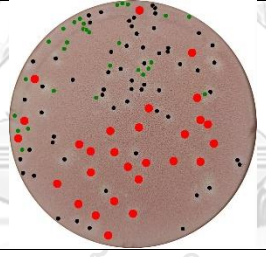

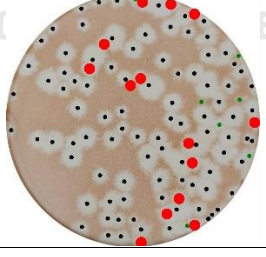
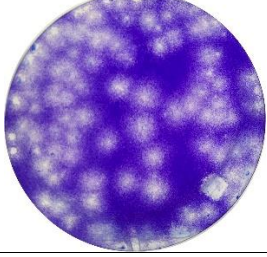
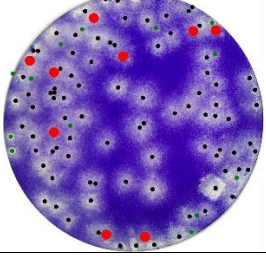
4.2 การนับ PFU ของไวรัสอื่นๆ ที่ไม่ใช่ไข้เลือดออก

จากการทดลองด้วยจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 90 รูปพบว่ากรรมวิธีที่นำเสนอให้ผลลัพธ์ที่ค่อนข้างมีแนวโน้มตรงกับผลลัพธ์ของผู้เชี่ยวชาญ โดยอาศัยการปรับค่า α ให้เหมาะสมกับภาพ ซึ่งช่วงในการปรับมีค่าใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 4-2 กรรมวิธีของ Premsattham และคณะและกรรมวิธีของ Claytor ไม่สามารถใช้นับ PFU ของไวรัสชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4-3 และ 4-4 เมื่อสีแดงและสีเขียวแสดง FN และ FP ตามลำดับ และยังพบว่าค่าขีดเริ่มเปลี่ยนสำหรับพื้นที่ PFU ของไวรัสต่างชนิดกันแตกต่างกันมาก ในการทดลองนี้จึงทดลองเฉพาะกรรมวิธีที่นำเสนอเท่านั้น


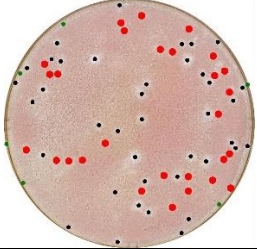

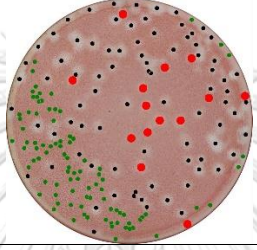

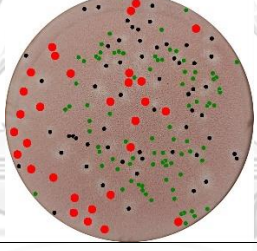

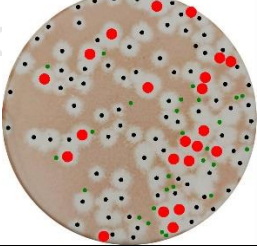
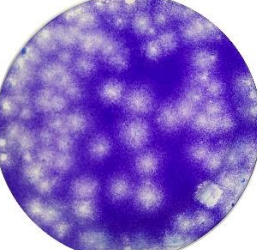
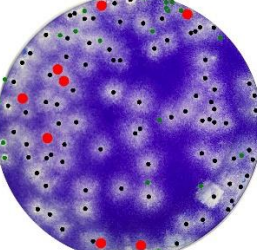
ตารางที่ 4-2 ผลการทดลองด้วยการกำหนดค่าถ่วงน้ำหนัก α ให้เหมาะสมของ
กรรมวิธีที่นำเสนอ (สีดำ-พบ PFU สีแดง-ไม่พบ PFU สีเขียว-ไม่ใช่ PFU)

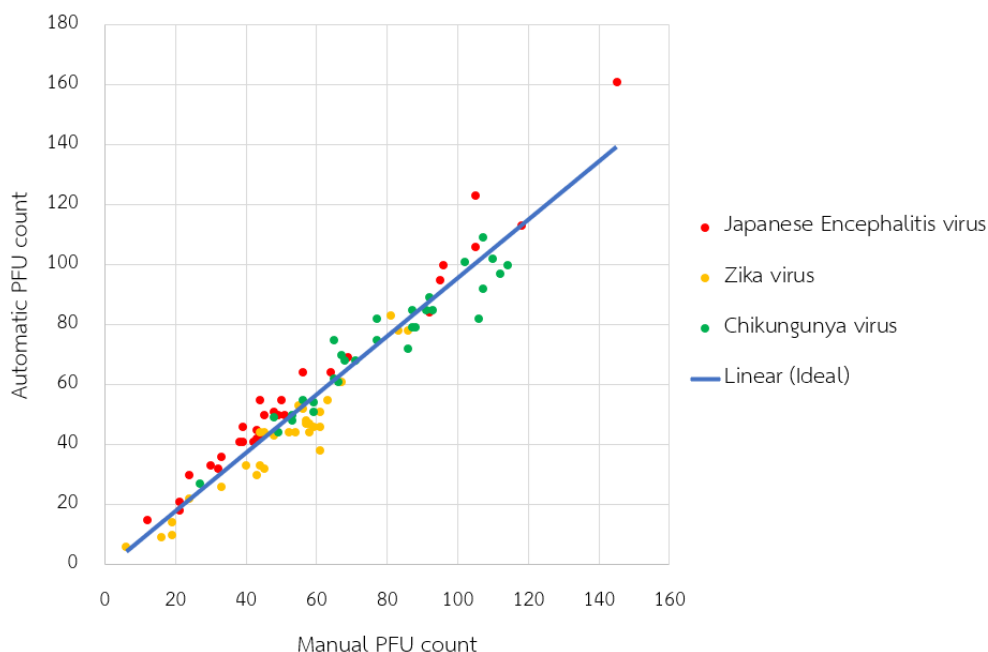
ภาพต้นฉบับ	ภาพผลลัพธ์	$\alpha_{optimal}$
		1
ไวรัสไข้เลือดออก		
		4
ไวรัสไข้สมองอักเสบ		
		1.1
ไวรัสไข้ฉีกา		
		1.1
ไวรัสไข้ปวดข้อยุ้งลาย		
		2.5
ไวรัสโคโรนา		

ตารางที่ 4-3 ผลการทดลองด้วยการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยนที่ดีที่สุดของกรรมวิธีของ
Premsattham และคณะ (สีดำ-พบ PFU สีแดง-ไม่พบ PFU สีเขียว-ไม่ใช่ PFU)

ภาพต้นฉบับ	ภาพผลลัพธ์	Threshold value
		200
ไวรัสไข้เลือดออก		
		165
ไวรัสไข้สมองอักเสบ		
		153
ไวรัสไข้ฉี่หนู		
		178
ไวรัสไข้ปวดข้อยุ้งลาย		
		160
ไวรัสโคโรนา		

ตารางที่ 4-4 ผลการทดลองด้วยการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยนที่ดีที่สุดของกรรมวิธีของ
Claytor (สีดำ-พบ PFU สีแดง-ไม่พบ PFU สีเขียว-ไม่ใช่ PFU)

ภาพต้นฉบับ	ภาพผลลัพธ์	Threshold value
		208
ไวรัสไข้เลือดออก		
		128
ไวรัสไข้สมองอักเสบ		
		115
ไวรัสไข้ซิกา		
		103
ไวรัสไข้วัดช้อยงลาย		
		128
ไวรัสโคโรนา		



รูปที่ 4-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ด้วยผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์
เมื่อวงกลมสีแดง สีเหลือง และสีเขียวแสดงผลการนับของไวรัสไข้สมองอักเสบ ไวรัสไข้ซิกา
ไวรัสไข้ปวดข้ออยู่ตามลำดับ

เมื่อนำกรรมวิธีที่นำเสนอมานับ PFU ของไวรัสอื่นได้ผลดังรูปที่ 4-2 และได้ผลการ
ทดลองตามตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ประสิทธิภาพของกรรมวิธีที่นำเสนอกับ PFU ชนิดต่างๆ ด้วย $\alpha_{optimal}$

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ				
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์กรรมวิธี (%)			
	Dengue virus	Japanese Encephalitis virus	Zika virus	Chikungunya virus
Error	6.53	8.1	17.42	7.52
Precision = TP/(TP+FP)	92.46	89.65	90.15	93.01
Sensitivity = TP/(TP+FN)	91.16	93.23	73.26	89.97
Coefficient of determination (R^2)	0.9272	0.9756	0.9252	0.9142

เนื่องจากกรรมวิธีที่นำเสนอออกแบบเพื่อนับ PFU ของไข้เลือดออก เมื่อไปนับ PFU ของไวรัสชนิดอื่นจึงได้ประสิทธิภาพน้อยลง แต่นอกจาก PFU ของไวรัสชิคาแล้วยังได้ความผิดพลาดน้อยกว่า 10% ทั้งความแม่นยำและความไวยังมีค่าสูง

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า กรรมวิธีที่นำเสนอมีความทนทาน (Robust) ต่อการเปลี่ยนชนิดไวรัส โดยผลการนับ PFU ของไวรัสชิคาที่มีค่าต่ำเพราะ PFU ของโรคไข้ชิคาไม่เด่นชัดและมีสีใกล้เคียงกับพื้นหลังมาก ส่งผลให้มีจำนวน FN สูง ขณะที่ไวรัสไข้ปวดข้อยุงลายถึงจะมีรูปร่างแตกต่างมาก แต่มี PFU ที่แตกต่างจากพื้นหลังมากจึงยังสามารถนับได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.3 การนับ PFU ที่ย้อมด้วยสี Crystal violet

ตารางที่ 4-6 แสดงผลการนับ PFU ด้วยกรรมวิธีที่นำเสนอเมื่อใช้ค่า $\alpha_{optimal}$ สังเกตว่าการนับไวรัสโคโรนามีค่าความผิดพลาดเกิน 10% เพราะ PFU ของไวรัสโคโรนามีขนาดใหญ่ ขอบฟุ้งกระจาย (รูปที่ 4-3.(i) และ 4-3.(iv)) เชื่อมต่อกันและโดดเด่นกว่าพื้นหลังมาก ทำให้บริเวณขอบคล้ายคลึงกับ PFU ที่บาง ไม่เด่นชัด ดังรูปที่ 4-3.(ii) และ 4-3.(v) จึงอาจเกิดเป็นพื้นที่ส่วนที่ยื่นออกมาหรือถูกแยกออกมาเป็นพื้นที่เดียวกันได้ ส่งผลให้เกิดการนับเกินได้เยอะ หากฟุ้งมากความผิดพลาดก็ยิ่งมากเช่นกัน ในทางกลับกันรูปที่ 4-3.(iii) มีขอบที่ราบเรียบกว่าในระดับหนึ่งทำให้นับเกินได้น้อยกว่า แสดงผลดังรูปที่ 4-3.(vi)

PFU ที่ถูกย้อมด้วยสี Crystal violet จำนวน 30 รูป มีสีแตกต่างจากพื้นหลังอย่างเด่นชัด ส่งผลให้การนับด้วยกรรมวิธีของ Premasattham และคณะ และ Claytor ให้ผลผิดพลาดน้อยกว่าการย้อมด้วยสี Neutral red ดังตัวอย่างการนับ PFU ของไวรัสโคโรนาในตารางที่ 4-6 ประสิทธิภาพของกรรมวิธีที่นำเสนอกับ PFU ที่ย้อมด้วยสี Crystal violet ของไวรัสโคโรนาด้วย $\alpha_{optimal}$

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ	
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์กรรมวิธี (%)
	Coronavirus
Error	14.72
Precision = $TP/(TP+FP)$	86.33
Sensitivity = $TP/(TP+FN)$	96.86

ตารางที่ 4-7 แต่ยังคงพบว่ามีแสงที่เลือกใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนที่ดีที่สุดสำหรับแต่ละภาพแล้ว กรรมวิธีของ Claytor ยังมีจำนวน PFU ที่นับผิดมากกว่ากรรมวิธีของ Premasatham และ คณะมาก ซึ่งมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น ไม่มีวงจรรองจึงทำให้ไม่มีการลดทอนสัญญาณ รบกวนขนาดเล็ก เนื่องจากพื้นที่ของแต่ละ PFU มีความสว่างไม่สม่ำเสมอ บริเวณที่มีความ สว่างมากอาจจะไม่อยู่ตรงกลางของพื้นที่เสมอไป เมื่อภาพผ่านวงจรรองหมวกสูงเพื่อเกลี่ย ความสว่างแล้ว พบว่าบางบริเวณขอบของแต่ละพื้นที่ที่มีความสว่างที่มากในบางกลุ่ม ทำให้ บริเวณนั้นถูกนับผิดเพิ่มเป็นอีกหนึ่ง PFU

4.4 ผลกระทบของพารามิเตอร์ในกรรมวิธีที่นำเสนอ

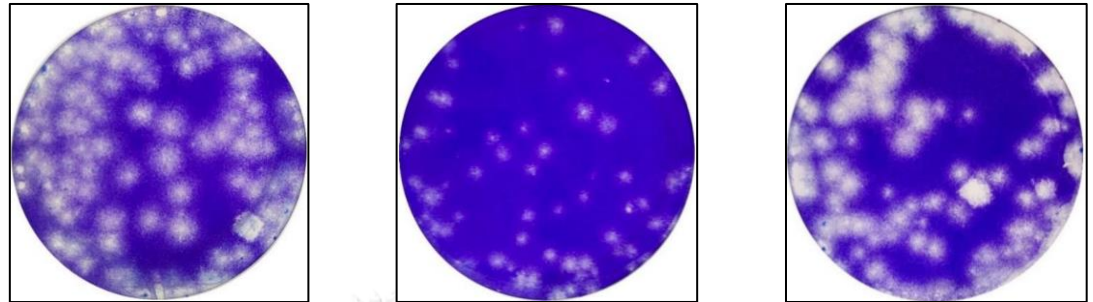
4.4.1 ผลกระทบของค่า α

อ้างอิงการทดลองในหัวข้อที่ 4.4.4 จึงได้ทดลองกำหนดค่า α สำหรับตัวอย่าง ที่ย้อมด้วยสี Neutral red และ Crystal violet เท่ากับ 1.1 และ 2 ตามลำดับ เรียก ค่านี้นว่า α_{fixed} และได้เปรียบเทียบผลการนับ PFU ด้วย α_{fixed} เทียบกับ α ที่ปรับ ให้เหมาะสมในแต่ละภาพ ($\alpha_{optimal}$) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4-4 ถึง 4-8 และตารางที่ 4-8 ถึง 4-12 จากการทดลองพบว่าการใช้ค่า $\alpha_{optimal}$ ทำให้การนับแม่นยำขึ้น แต่ เมื่อพิจารณาผลการนับแต่ละตัวอย่างพบว่า α_{fixed} และ $\alpha_{optimal}$ ส่วนมากให้ผลไม่ แตกต่างกัน (สังเกตจากรูปที่ 4-4 ถึง 4-8) มีเพียงบางกรณีที่มี α_{fixed} ให้ผลเพียงมาก ดังจุดภายในวงกลมสีดำ จึงพิจารณาให้ผู้ใช้อำหนด α เอง ในกรณีที่ผู้ใช้สังเกตเห็น การนับผิดสูง

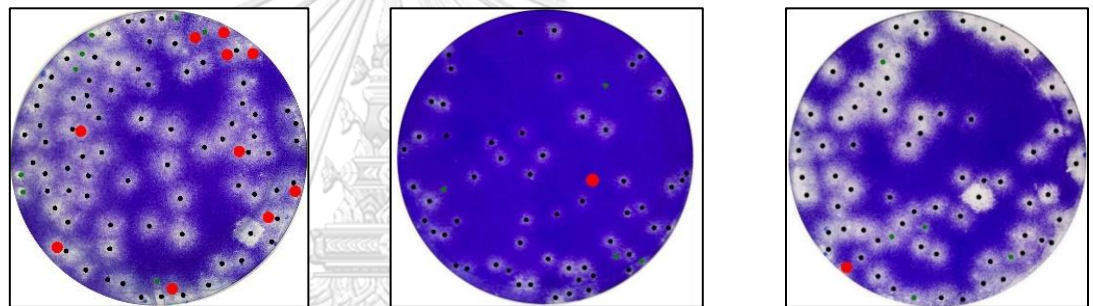
เพื่อให้กำหนด α ได้ง่าย จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง α และผลการนับ PFU ได้ดังรูปที่ 4-9 และ 4-10 จะเห็นว่าช่วงของค่า α ที่เหมาะสมกว้าง ไม่ จำเป็นต้องปรับให้ละเอียดมาก โดยเมื่อวิเคราะห์แล้วเห็นว่าการเพิ่มค่า α เปรียบเสมือนเพิ่มความสว่างให้กับภาพ หากตั้งค่าน้อยไปจะไม่สามารถแยก PFU ออกจากฉากหลังได้ แต่ถ้ามากไปจะพิจารณาฉากหลังเข้ามาเป็น PFU ดังแสดงในรูป ที่ 4-11 และสรุปเป็นรายละเอียดได้ดังนี้

1. กรณีที่เริ่มใช้ค่า α เท่ากับ 1.1 (α_{fixed}) พบว่ายังมี PFU หลายจำนวนที่ไม่ ถูกนับ ซึ่งแทบจะไม่พบ PFU ในกรณีที่มีค่า α น้อยกว่า ดังรูปที่ 4-11.(i)-(iii) สังเกตว่ายังไม่พบการนับพื้นหลังเป็น PFU จึงเป็นไปได้ว่า หากเพิ่มค่า α จะทำให้พบ PFU บริเวณอื่นอีก ดังรูปที่ 4-11.(iv)-(vii)

2. กรณีเพิ่มค่า α แล้วพบว่าจำนวน PFU ไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม แต่พบพื้นหลังที่ถูกพิจารณาเป็นพื้นที่ของ PFU มากขึ้น เนื่องจากบริเวณพื้นหลังมีความสว่างขึ้นเรื่อยๆ ดังรูปที่ 4-11.(viii)-(ix) แล้วควรหยุดการเพิ่มค่า α



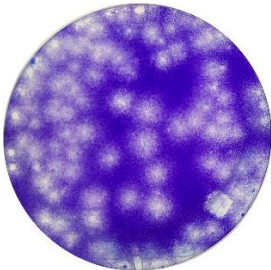
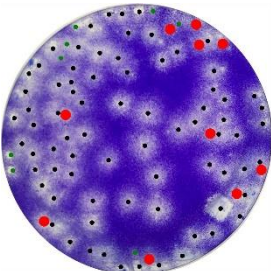
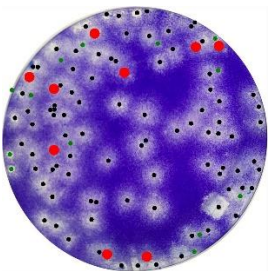
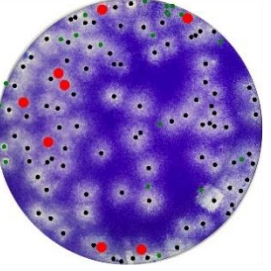
(i) ภาพต้นฉบับไวรัสโคโรนาที่มีขอบฟุ้งกระจายเยอะ (ii) ภาพต้นฉบับไวรัสโคโรนาที่มีลักษณะบาง ไม่ชัด (iii) ภาพต้นฉบับไวรัสโคโรนาที่มีขอบราบเรียบ

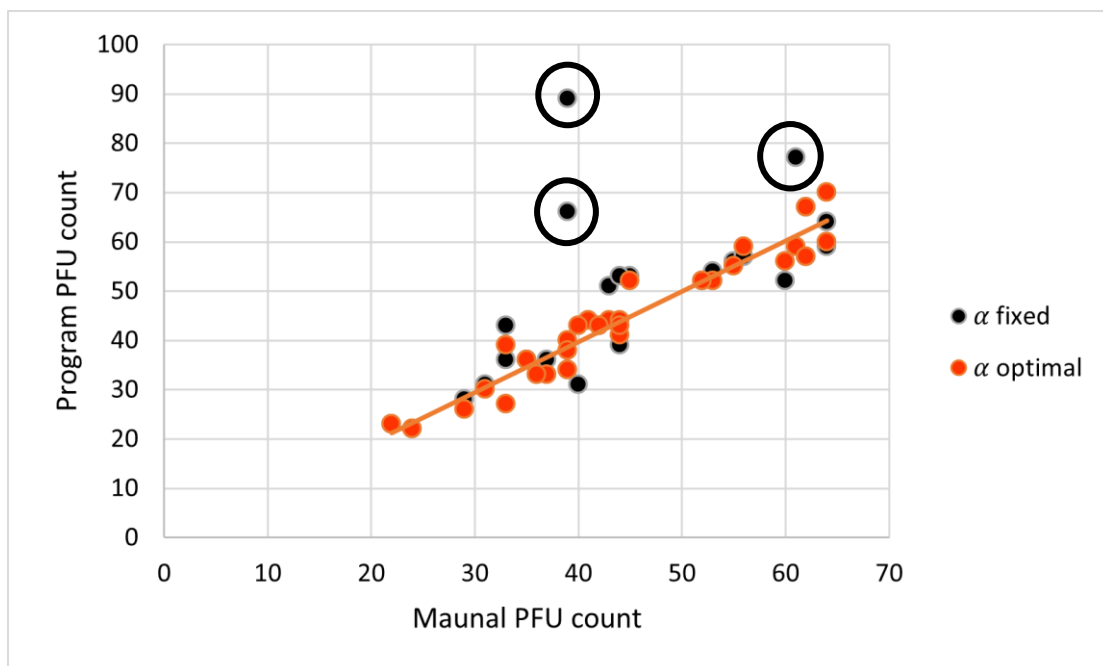


(iv) ผลการนับของภาพ (i) (v) ผลการนับของภาพ (ii) (vi) ผลการนับของภาพ (iii)

รูปที่ 4-3 ลักษณะ PFU ของไวรัสโคโรนาที่ย้อมสีด้วย Crystal violet และผลที่ได้จากการนับ (สีดำ-พบ PFU สีแดง-ไม่พบ PFU สีเขียว-ไม่ใช่ PFU)

ตาราง 4-7 ผลการทดลองด้วยการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยนที่ดีที่สุดของกรรมวิธีที่นำเสนอ กรรมวิธีของ Premsattham และคณะและกรรมวิธีของ Claytor โดยไวรัสโคโรนา

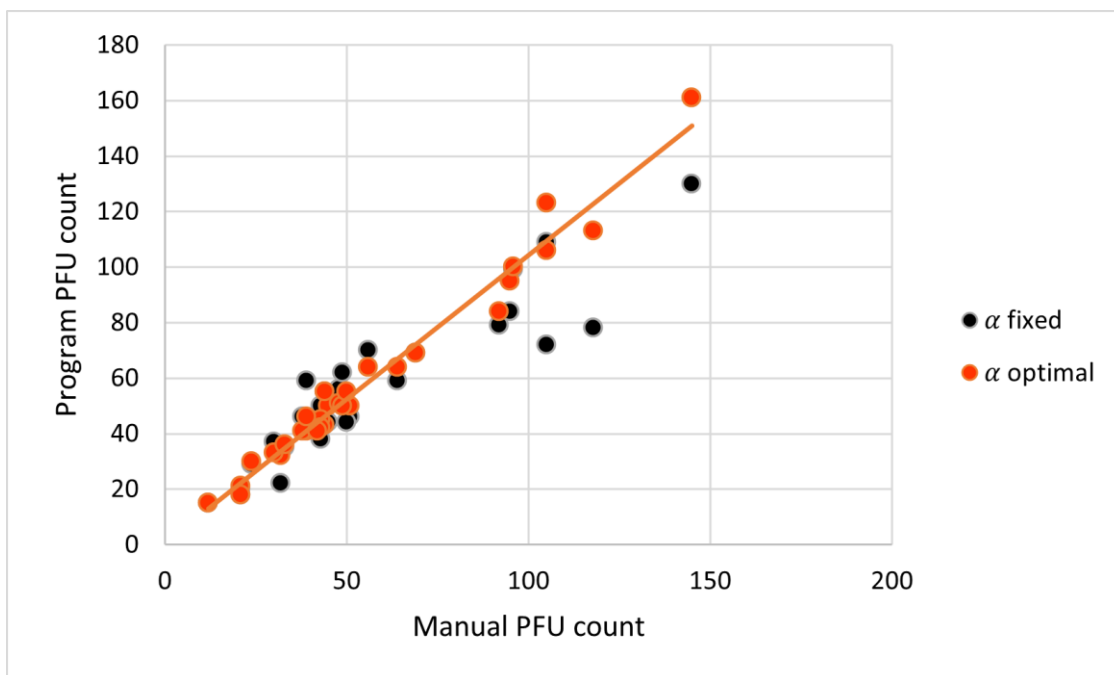
ภาพต้นฉบับ	กรรมวิธีที่นำเสนอ	Premsattham และคณะ	Claytor
			
	$\alpha_{optimal} = 2.5$	Threshold = 160	Threshold = 128



รูปที่ 4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ของไวรัสไข้เลือดออกจากคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีดำ และสีแดงแสดงผลการนับจากการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักที่และไม่คงที่ ตามลำดับ และเส้นตรงสีดำแสดงตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตารางที่ 4-8 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่นำเสนอ โดยการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักที่และค่าถ่วงน้ำหนักไม่คงที่ของไวรัสไข้เลือดออก

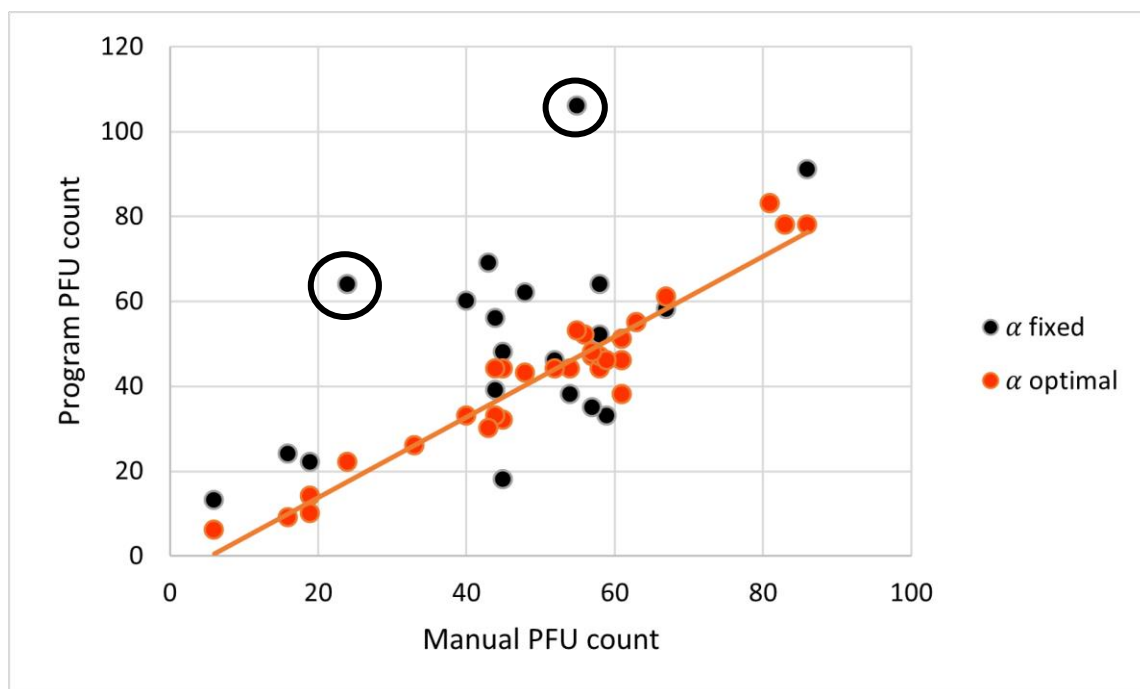
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ		
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)	
	α_{fixed}	$\alpha_{optimal}$
Error	15.05	6.53
Precision = $TP/(TP+FP)$	87.8	92.46
Sensitivity = $TP/(TP+FN)$	91.26	91.16
Coefficient of determination (R^2)	0.4836	0.9272



รูปที่ 4-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ของไวรัสไข้สมองอักเสบจากคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีดำ และสีแดงแสดงผลการนับจากการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และไม่คงที่ ตามลำดับ และเส้นตรงสีแดงแสดงตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตารางที่ 4-9 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่น่าเสนอ โดยการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และค่าถ่วงน้ำหนักไม่คงที่ของไวรัสไข้สมองอักเสบ

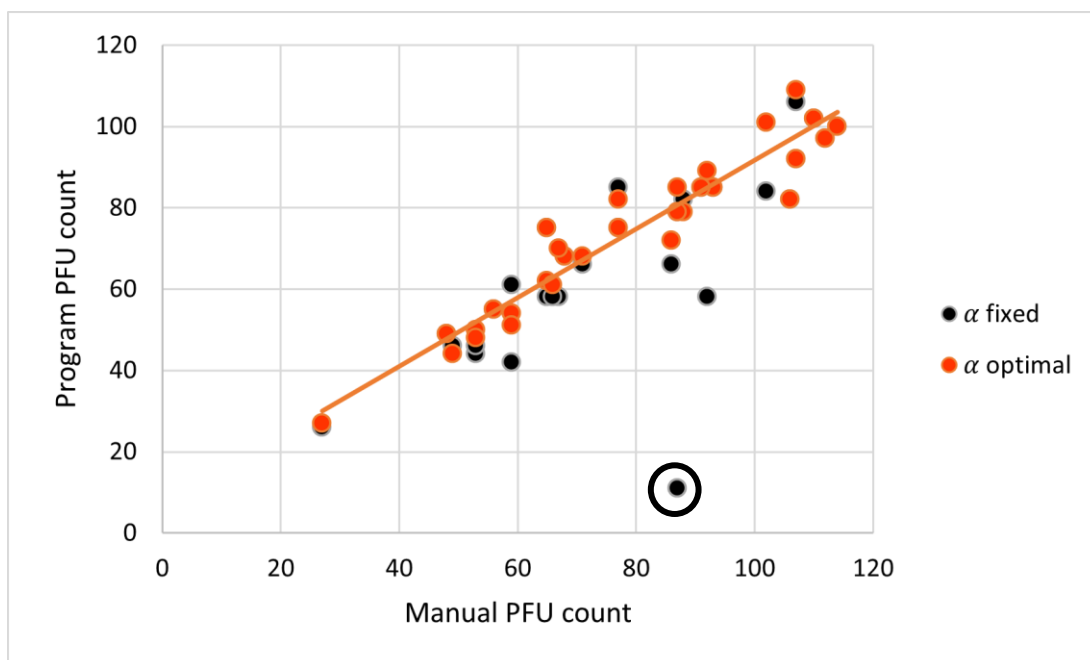
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ		
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)	
	α_{fixed}	$\alpha_{optimal}$
Error	15.97	8.1
Precision = TP/(TP+FP)	87.04	89.65
Sensitivity = TP/(TP+FN)	86.85	93.23
Coefficient of determination (R^2)	0.8584	0.9756



รูปที่ 4-6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ของไวรัสไข้ฉีกาจากคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีดำ และสีแดงแสดงผลการนับจากการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และไม่คงที่ ตามลำดับ และเส้นตรงสีส้มแสดง ตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตารางที่ 4-10 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่นำเสนอ โดยการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่ และค่าถ่วงน้ำหนักไม่คงที่ของไวรัสไข้ฉีกา

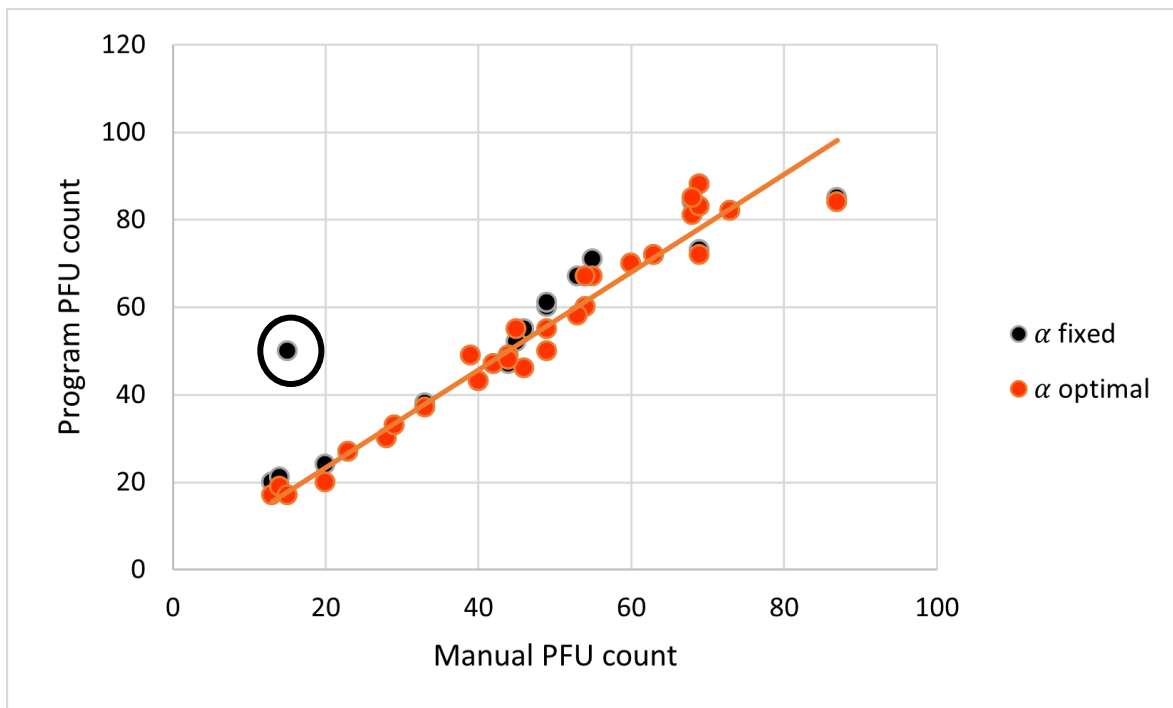
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ		
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)	
	α_{fixed}	$\alpha_{optimal}$
Error	34.09	17.42
Precision = $TP/(TP+FP)$	77.63	90.15
Sensitivity = $TP/(TP+FN)$	73.17	73.26
Coefficient of determination (R^2)	0.4107	0.9252



รูปที่ 4-7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ของไวรัสใช้ปดข้อยุ่งลายจากคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีดำ และสีแดงแสดงผลการนับจากการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และไม่คงที่ตามลำดับ และเส้นตรงสีส้มแสดงตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตารางที่ 4-11 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่นำเสนอ โดยการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และค่าถ่วงน้ำหนักไม่คงที่ของไวรัสใช้ปดข้อยุ่งลาย

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ		
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)	
	α_{fixed}	$\alpha_{optimal}$
Error	13.83	7.52
Precision = TP/(TP+FP)	92.78	93.01
Sensitivity = TP/(TP+FN)	82.85	89.07
Coefficient of determination (R^2)	0.5904	0.9142



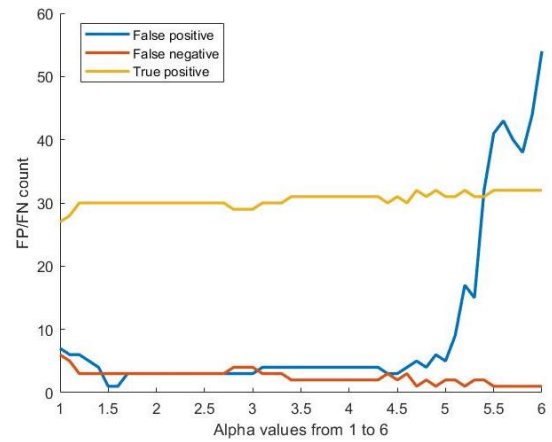
รูปที่ 4-8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการนับ PFU ของโคโรนาไวรัสจากคอมพิวเตอร์ เมื่อวงกลมสีดำ และสีแดงแสดงผลการนับจากการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่และไม่คงที่ ตามลำดับ และเส้นตรงสีส้มแสดงตำแหน่งที่การนับของผู้เชี่ยวชาญและคอมพิวเตอร์สอดคล้องกัน

ตารางที่ 4-12 ประสิทธิภาพการนับ PFU ของกรรมวิธีที่นำเสนอ โดยการใช้ค่าถ่วงน้ำหนักคงที่ และค่าถ่วงน้ำหนักไม่คงที่ของโคโรนาไวรัส

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ		
ปริมาณเปรียบเทียบ	ผลลัพธ์ของกรรมวิธี (%)	
	α_{fixed}	$\alpha_{optimal}$
Error	26.48	14.72
Precision = TP/(TP+FP)	80.92	86.33
Sensitivity = TP/(TP+FN)	96.64	96.86
Coefficient of determination (R^2)	0.8864	0.9538



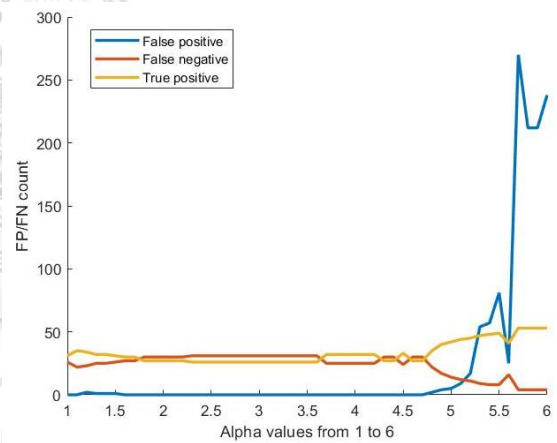
(i) ภาพต้นฉบับ

(ii) $\alpha = 4$

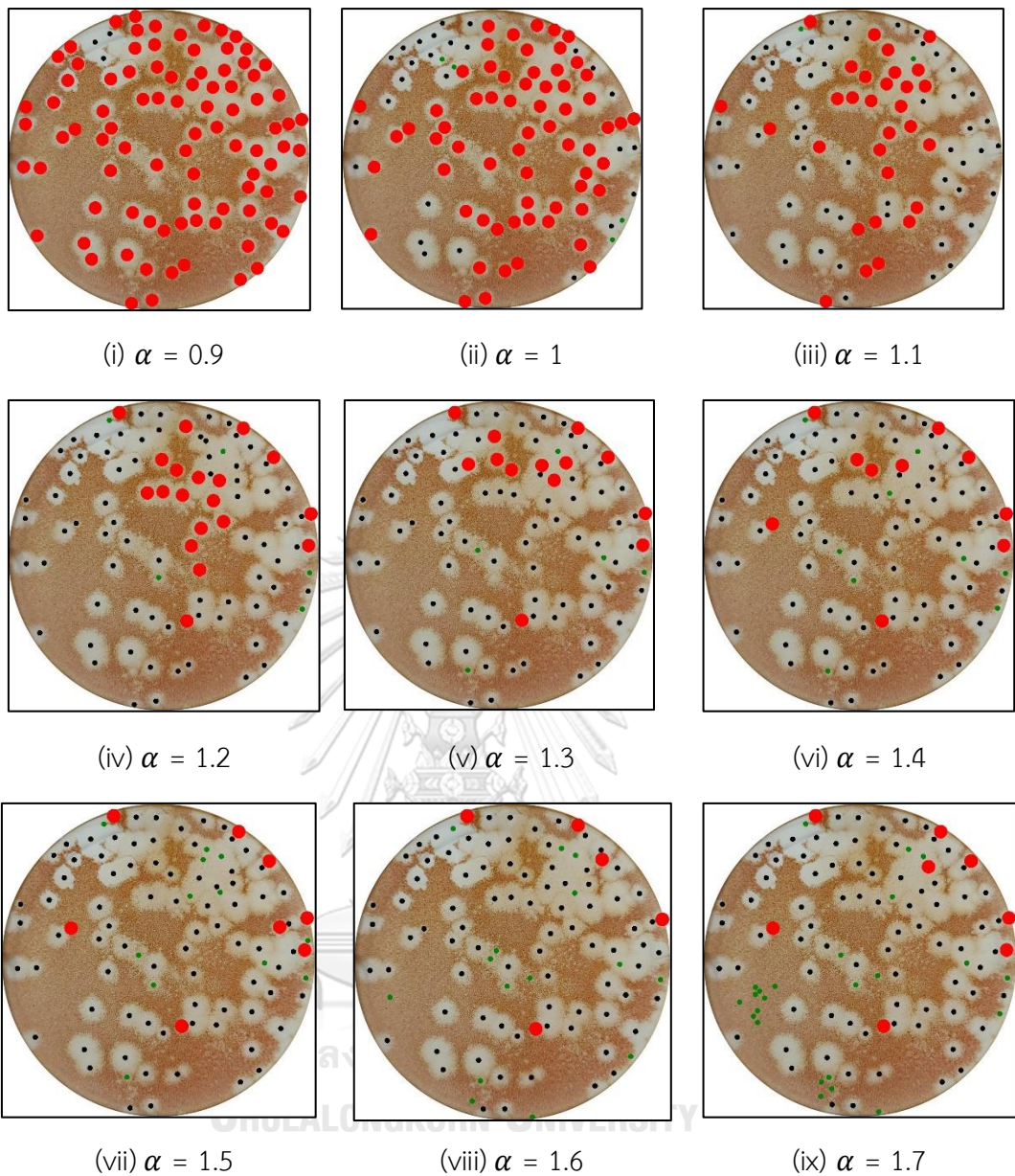
รูปที่ 4-9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า α และผลลัพธ์ที่ได้จากการนับสำหรับไวรัสไข้สมองอักเสบ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1 ถึง 6 ซึ่งค่าถูกเพิ่มขึ้นทีละ 0.1



(i) ภาพต้นฉบับ

(ii) $\alpha = 5$

รูปที่ 4-10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า α และผลลัพธ์ที่ได้จากการนับสำหรับไวรัสไข้ซิกา โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1 ถึง 6 ซึ่งค่าถูกเพิ่มขึ้นทีละ 0.1



รูปที่ 4-11 ผลการนับ PFU ของไวรัสไข้ปวดข้อยุ้งลาย เมื่อเปลี่ยนค่า α (สีดำ สีเขียวและสีแดง แสดงผลที่ตรงกับผู้เชี่ยวชาญ ส่วนที่นับเกินและส่วนที่ไม่ถูกนับ ตามลำดับ)

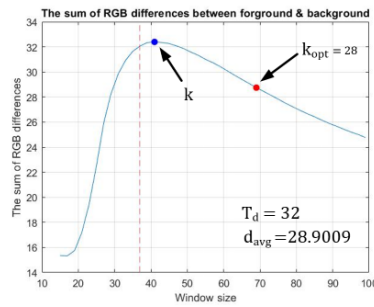
4.4.2 ผลกระทบของขนาดวินโดว์ของค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้

จากการทดลองพบว่าขนาดวินโดว์ที่ใช้คำนวณค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแปลงปรับตัวได้ ส่งผลกระทบต่อความแม่นยำ จึงแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 กรณี ดังต่อไปนี้

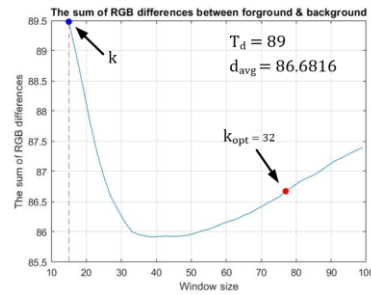
1. กรณี PFU ขนาดเล็ก ได้แก่ ไวรัสไข้เลือดออก ไวรัสไข้สมองอักเสบ ไวรัสชิคา ที่ความเด่นชัดของ PFU บริเวณกลางหลุมและขอบหลุมแตกต่างกัน เนื่องจากบริเวณขอบหลุมมีความสว่างกว่ากลางหลุมส่งผลให้ PFU บริเวณ

นี้กลมกลืนไปกับพื้นหลัง ในกรณีของไวรัสไข้เลือดออกและไข้สมองอักเสบ พบว่า PFU ตรงกลางหลุมเด่นชัดส่งผลให้ขนาดวินโดว์ของการค้นหา PFU บริเวณกลางหลุมเล็กกว่าบริเวณขอบหลุม ดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 ขณะที่กรณีของไวรัสไข้ซิกา PFU แตกต่างกับฉากหลังน้อยกว่าจึงใช้วินโดว์บริเวณกลางหลุมใหญ่กว่าบริเวณขอบหลุม ดังรูปที่ 4.13 แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลรวมของความต่างของสัญญาณเฉลี่ยระหว่าง PFU และพื้นหลัง สรุปได้ดังนี้

1. ในช่วงแรกเมื่อเพิ่มขนาดวินโดว์ พื้นที่ PFU จะถูกนับเป็นพื้นหน้าเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสว่างเฉลี่ยสูงขึ้น ขณะที่พื้นหลังมีความสว่างเฉลี่ยลดลงทำให้ความแตกต่างเพิ่ม
 2. เมื่อเพิ่มขนาดวินโดว์มากไปจะมีพื้นที่หลุมถูกนับเข้ามาเป็นพื้นหน้าส่งผลให้ความสว่างเฉลี่ยของพื้นหน้าลดลง ทำให้ความแตกต่างลดลง
- พื้นที่ขอบหลุมที่แสดงในรูปที่ 4-12.(ii) รูปที่ 4-13.(ii) และรูปที่ 4-14.(ii) ขึ้นอยู่กับ α (ค่าถ่วงน้ำหนัก) ที่จะช่วยเพิ่มความสว่างให้กับภาพทำให้การเปลี่ยนแปลงมีหลายรูปแบบ
2. กรณี PFU ขนาดใหญ่ ได้แก่ ไวรัสไข้ปวดข้ออยู่กลาง ไวรัสโคโรนา ซึ่งสามารถค้นหา PFU โดยใช้ขนาดวินโดว์เดียวกันทั้งกลางหลุมและขอบหลุมได้ เนื่องจาก PFU มีลักษณะที่เด่นชัดกว่าพื้นหลังของทั้งสองบริเวณ แสดงดังรูปที่ 4-15 และรูปที่ 4-16

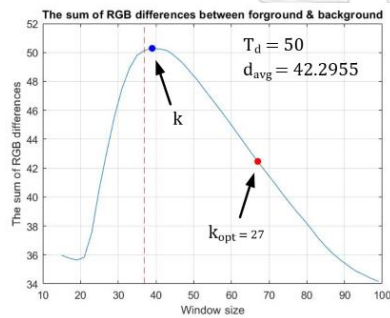


(i) Optimal window size = 69x69

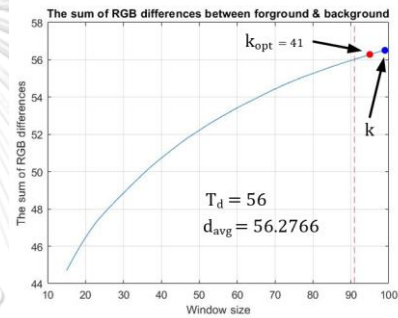


(ii) Optimal window size = 77x77

รูปที่ 4-12 ความสัมพันธ์ของขนาดวินโดว์สำหรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้กับความต่างของช่องสัญญาณ RGB สำหรับไวรัสไข้เลือดออก (i) บริเวณพื้นที่กลางหลุมและ (ii) ขอบหลุม

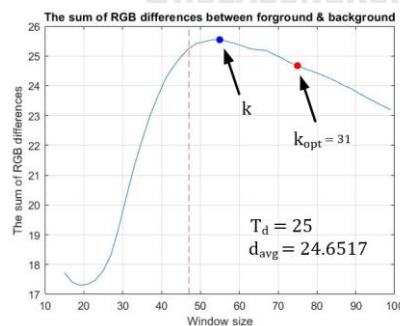


(i) Optimal window size = 67x67

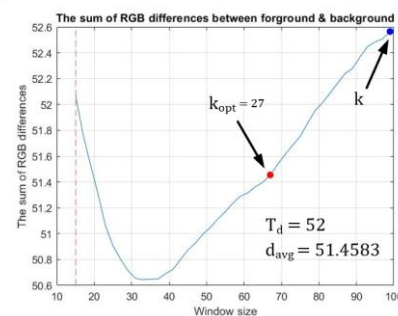


(ii) Optimal window size = 95x95

รูปที่ 4-13 ความสัมพันธ์ของขนาดวินโดว์สำหรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้กับความต่างของช่องสัญญาณ RGB ไวรัสไข้สมองอักเสบ (i) บริเวณพื้นที่กลางหลุมและ (ii) ขอบหลุม

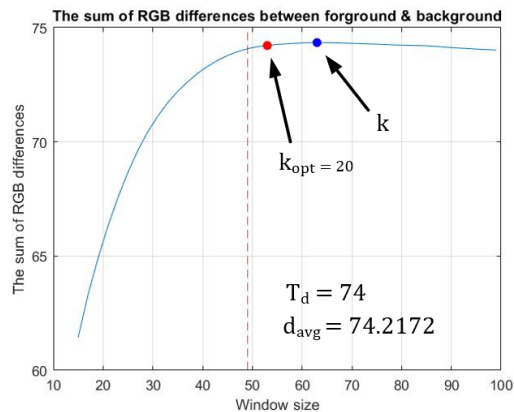


(i) Optimal window size = 75x75



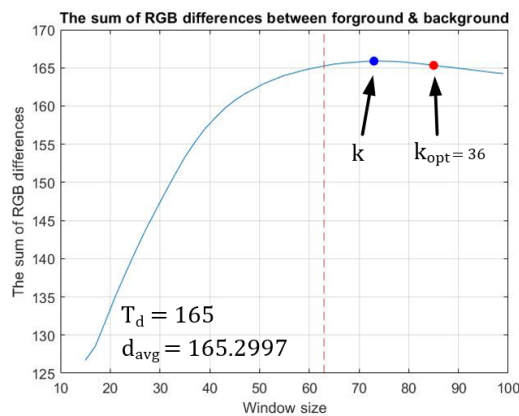
(ii) Optimal window size = 67x67

รูปที่ 4-14 ความสัมพันธ์ของขนาดวินโดว์สำหรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้กับความต่างของช่องสัญญาณ RGB ไวรัสไข้ซิกา (i) บริเวณพื้นที่กลางหลุมและ (ii) ขอบหลุม



Optimal window size = 53x53

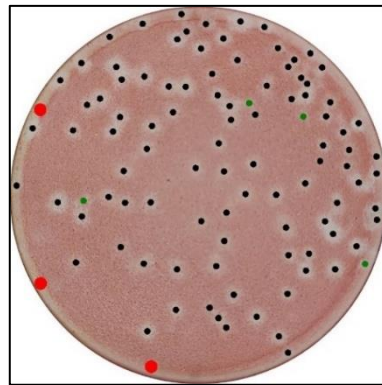
รูปที่ 4-15 ความสัมพันธ์ของขนาดวินโดว์สำหรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้กับความต่างของช่องสัญญาณ RGB สำหรับไวรัสไข้วัดข้อยุ่งลาย บริเวณพื้นที่กลางหลุมและขอบหลุม



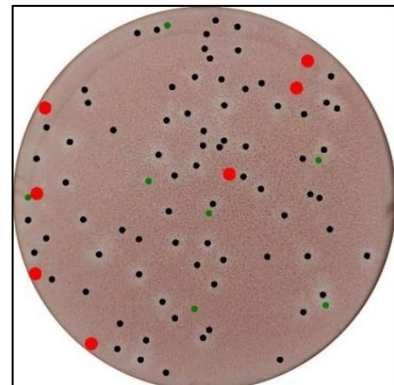
Optimal window size = 85x85

รูปที่ 4-16 ความสัมพันธ์ของขนาดวินโดว์สำหรับค่าขีดเริ่มเปลี่ยนแบบปรับตัวได้กับความต่างของช่องสัญญาณ RGB สำหรับไวรัสโคโรนา บริเวณพื้นที่กลางหลุมและขอบหลุม

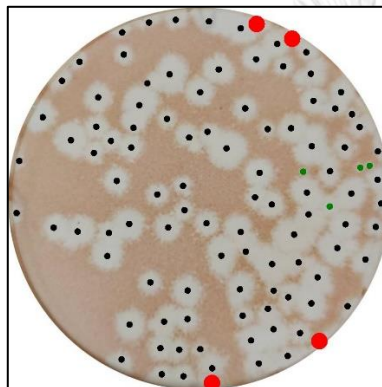
4.5 ภาพผลลัพธ์ของจำนวน PFU จากไวรัสชนิดอื่น ด้วย $\alpha_{optimal}$



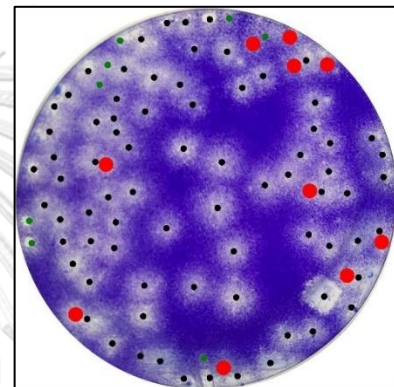
(i) ไวรัสไข้สมองอักเสบ



(ii) ไวรัสไข้ซิกา



(iii) ไวรัสไข้วอดซ้อยุงลาย



(iv) ไวรัสโคโรนา

รูปที่ 4-17 ผลลัพธ์ภาพที่ได้จากไวรัสชนิดต่างๆ ซึ่งสีดำ-PFU ที่หาเจอ สีแดง-PFU ที่หาไม่เจอ สีเขียว-จุดที่ไม่ใช่ PFU

ค่า α ที่เหมาะสมแต่ละภาพขึ้นกับอัตราส่วนความสว่างของพื้นหลังในช่องสัญญาณที่เกี่ยวข้อง แต่เนื่องจากเราไม่มีข้อมูลพื้นหลังในภาพที่ใช้งานจริงจึงต้องให้ผู้ใช้ปรับค่า α ตามความเหมาะสมและแสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่า α ที่ผู้ใช้ปรับเองและการหาอัตราส่วนไว้ในหัวข้อที่ 4.4.3

4.4.3 การเปรียบเทียบระหว่างค่า α ที่ผู้ใช้ปรับค่าเองกับการคำนวณ

จากแนวคิดที่พื้นหลังมีความสว่างในแต่ละช่องสัญญาณของปริภูมิ CIE-XYZ แตกต่างกันแต่ PFU มีความสว่างใกล้เคียงกันแล้ว จึงสามารถเพิ่มความแตกต่างของ PFU และพื้นหลังได้ด้วยการหาผลต่างของสองช่องสัญญาณที่มีการปรับค่าความสว่างให้เท่ากันและสรุปแยกตามชนิดสียอมได้ดังนี้

1. กรณี PFU ที่ย้อมสีด้วย Neutral red จะเริ่มจากการคำนวณค่าเฉลี่ยบริเวณพื้นหลังของข้อมูลช่องสัญญาณ Z และ X แสดงดังรูปที่ 4-18 เพื่อหาค่า $\alpha_{initial}$ ที่จะเกลี่ยความสว่างพื้นหลังของทั้งสองช่องสัญญาณให้เท่ากัน ดังสมการที่ (15)

$$\alpha_{initial} = \frac{X_{avg}}{Z_{avg}} \quad (15)$$

เมื่อ $\alpha_{initial}$ คือค่าถ่วงน้ำหนักเริ่มต้น

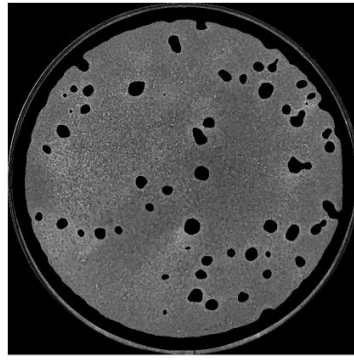
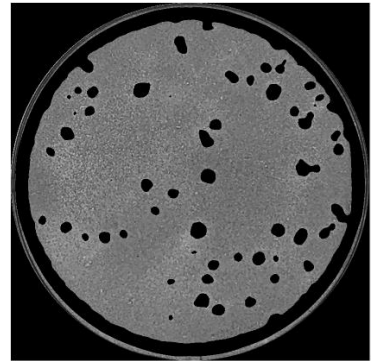
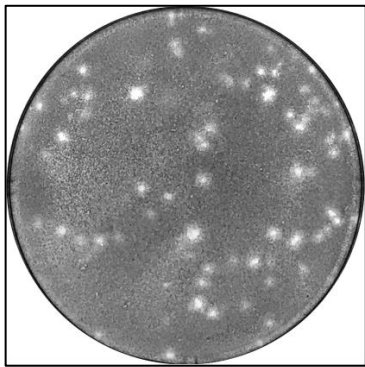
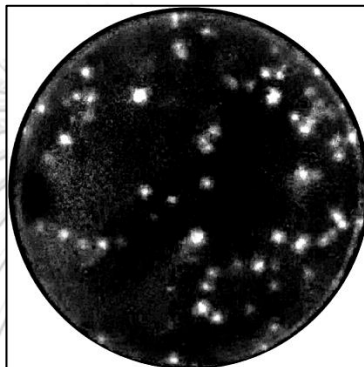
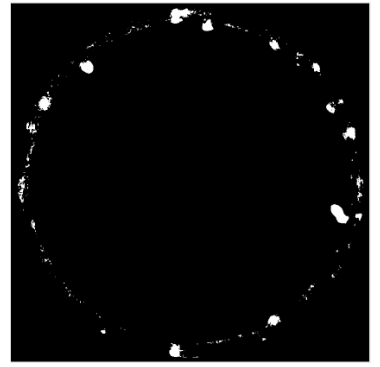
Z_{avg} คือค่าเฉลี่ยความสว่างของช่องสัญญาณ Z ของปริภูมิสี CIE-XYZ

X_{avg} คือค่าเฉลี่ยความสว่างของช่องสัญญาณ X ของปริภูมิสี CIE-XYZ

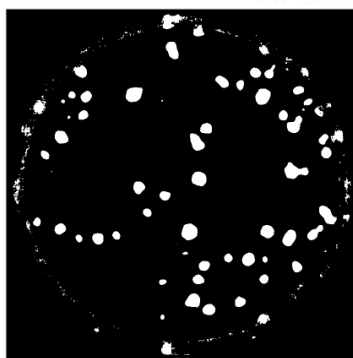
เมื่อทำการเปรียบเทียบผลลัพธ์ระหว่าง $\alpha_{initial}$ และ $\alpha_{optimal}$ ของไวรัสไข้เลือดออกที่ย้อมสีด้วย Neutral red จะให้ผลดังรูปที่ 4-19 และ 4-20



(i) ภาพต้นฉบับไวรัสไข้เลือดออก

(ii) ข้อมูลช่องสัญญาณ Z ของภาพพื้นหลังซึ่งมี $Z_{avg} = 0.3969$ (iii) ข้อมูลช่องสัญญาณ X ของภาพพื้นหลังซึ่งมี $X_{avg} = 0.4678$ (iv) ข้อมูลรูปภาพของช่องสัญญาณ Z เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.18$ (v) ข้อมูลรูปภาพจากผลต่างของช่องสัญญาณ Z และ X เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.18$ โดยเพิ่มความสว่างเป็น 5 เท่า

(vi) ผลลัพธ์ภาพหลังจากใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนของ PFU บริเวณขอบหลุม



(vii) ผลลัพธ์ภาพจากการรวมกันของ PFU บริเวณกลางหลุมและขอบหลุม

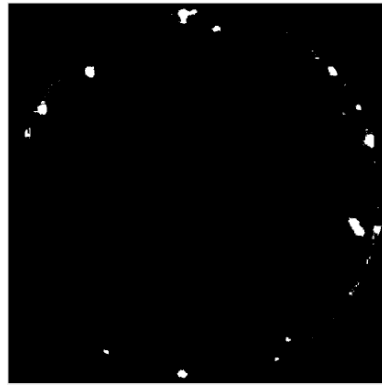


(viii) ภาพ (vii) เมื่อกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด

รูปที่ 4-18 วิธีการหาค่าเริ่มต้นของ $\alpha_{initial}$ เพื่อค้นหา PFU บริเวณขอบหลุมด้วยภาพไวรัสไข้เลือดออก

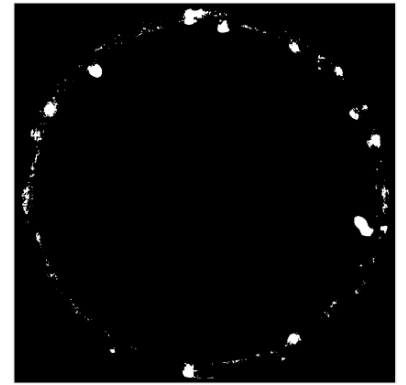


(i) ภาพต้นฉบับไวรัสไข้เลือดออก



(ii) PFU บริเวณขอบหลุม เมื่อ

$$\alpha_{optimal} = 1$$



(iii) PFU บริเวณขอบหลุม

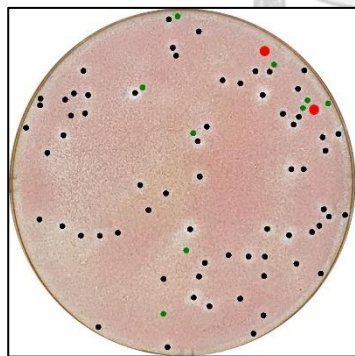
$$\text{เมื่อ } \alpha_{initial} = 1.18$$



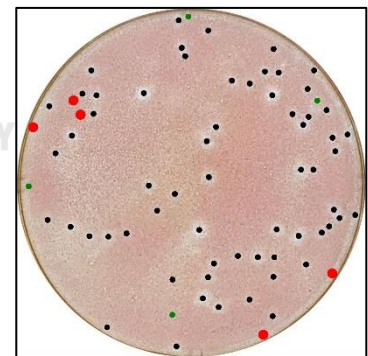
(iv) ภาพ (ii) หลังจากกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด



(v) ภาพ (iii) หลังจากกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด



(vi) ผลการนับ PFU ของภาพ (iv)

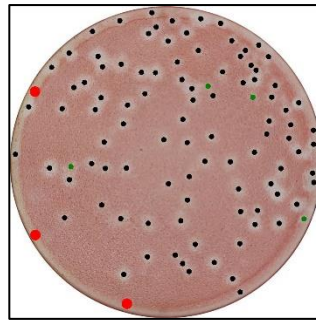
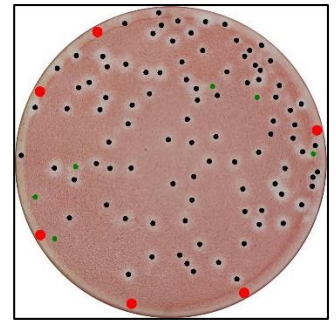


(vii) ผลการนับ PFU ของภาพ (v)

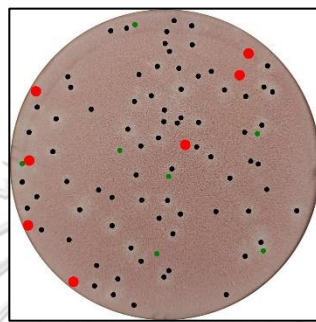
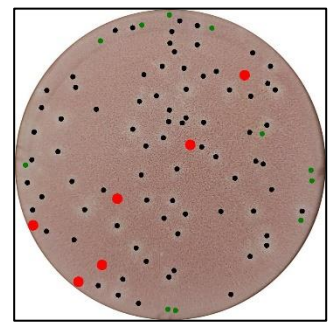
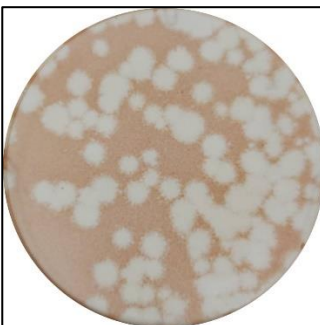
รูปที่ 4-19 การเปรียบเทียบความต่างระหว่างภาพที่ได้จากการใช้ $\alpha_{initial}$ และ $\alpha_{optimal}$ ด้วยภาพไวรัสไข้เลือดออก
เมื่อ สีดำ-ผลการนับที่ตรงกับผู้เชี่ยวชาญ สีแดง-ไม่ถูกนับ สีเขียว-นับไม่ถูกต้อง



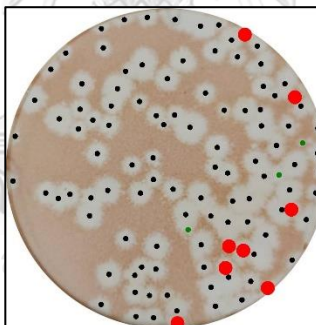
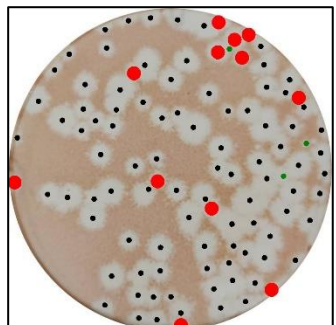
(i) ภาพต้นฉบับไวรัสใช้สมองอักเสบ

(ii) ผลการนับ (i) เมื่อ $\alpha_{optimal} = 4$ (iii) ผลการนับ (i) เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.33$ 

(iv) ภาพต้นฉบับไวรัสใช้ซิกา

(v) ผลการนับ (iv) เมื่อ $\alpha_{optimal} = 1.1$ (vi) ผลการนับ (iv) เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.23$ 

(vii) ภาพต้นฉบับไวรัสใช้ปวดข้อยุ้งลาย

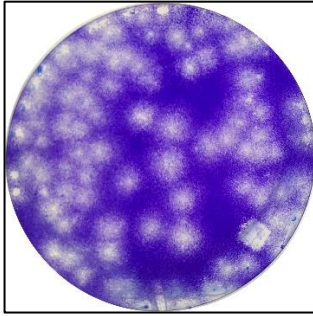
(viii) ผลการนับ (vii) เมื่อ $\alpha_{optimal} = 1$ (ix) ผลการนับ (vii) เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.08$

รูปที่ 4-20 การเปรียบเทียบความต่างระหว่างผลการนับจากการใช้ $\alpha_{initial}$ และ $\alpha_{optimal}$ ด้วยภาพไวรัสชนิดอื่นเมื่อ สีดำ-ผลการนับที่ตรงกับผู้เชี่ยวชาญ สีแดง-ไม่ถูกนับ สีเขียว-นับไม่ถูกต้อง

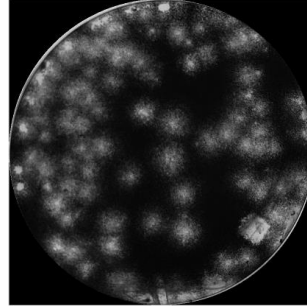
- กรณี PFU ที่ย้อมสีด้วย Crystal violet จะเริ่มจากการคำนวณค่าเฉลี่ยบริเวณพื้นหน้าและพื้นหลัง (ใช้ทั้งภาพ) ของข้อมูลช่องสัญญาณ Y และ X แสดงดังรูปที่ 4-21 เพื่อหาค่า $\alpha_{initial}$ ที่จะเกิดแสงสว่างของทั้งสองช่องสัญญาณ ดังสมการที่ (16)

$$\alpha_{initial} = \frac{X_{avg}}{Y_{avg}} \quad (16)$$

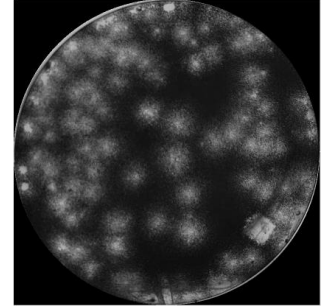
เมื่อ Y_{avg} คือค่าเฉลี่ยความสว่างของช่องสัญญาณ Y ของปริภูมิสี CIE-XYZ



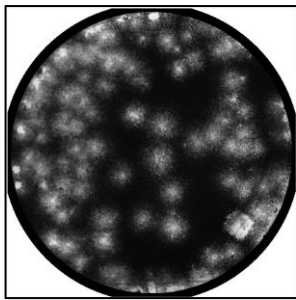
(i) ภาพต้นฉบับไวรัสโคโรนา



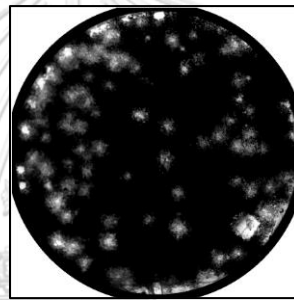
(ii) ข้อมูลช่องสัญญาณ Y ของภาพพื้นหลังซึ่งมี $Y_{avg} = 0.1857$



(iii) ข้อมูลช่องสัญญาณ X ของภาพพื้นหลังซึ่งมี $X_{avg} = 0.2275$



(iv) ข้อมูลรูปภาพของช่องสัญญาณ Y เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.23$



(v) ข้อมูลรูปภาพจากผลต่างของช่องสัญญาณ Y และ X เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.23$ โดยเพิ่มความสว่างเป็น 5 เท่า



(vi) ผลลัพธ์ภาพหลังจากใช้ค่าขีดเริ่มเปลี่ยนของ PFU บริเวณขอบและกลางหลุม

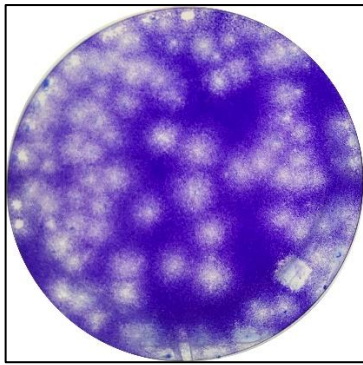


(vii) PFU ทั้งหมดบริเวณขอบและกลางหลุม



(viii) ภาพ (vii) เมื่อกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด

รูปที่ 4-21 วิธีการหาค่าเริ่มต้นของ $\alpha_{initial}$ เพื่อค้นหา PFU บริเวณขอบและกลางหลุมด้วยภาพไวรัสโคโรนา



(i) ภาพต้นฉบับไวรัสโคโรนา



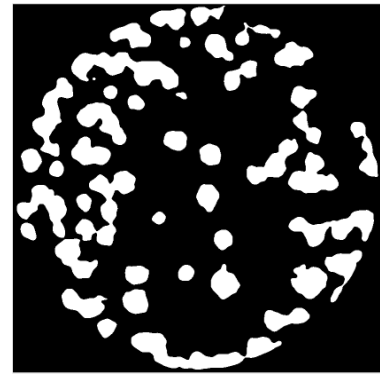
(ii) PFU บริเวณขอบและกลางหลุม



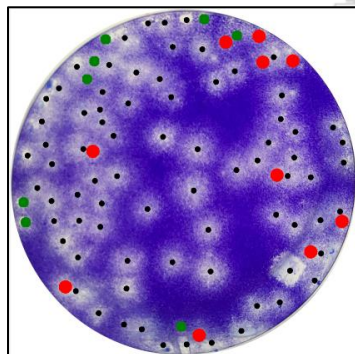
(iii) PFU บริเวณขอบและกลางหลุม

เมื่อ $\alpha_{optimal} = 2.5$ เมื่อ $\alpha_{initial} = 1.23$ 

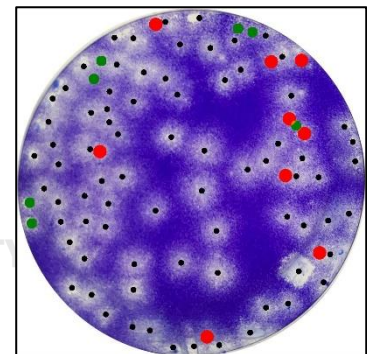
(iv) ภาพ (ii) หลังจากกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด



(v) ภาพ (iii) หลังจากกำจัดสัญญาณรบกวนด้วยการเปิด



(vi) ผลการนับ PFU ของภาพ (iv)



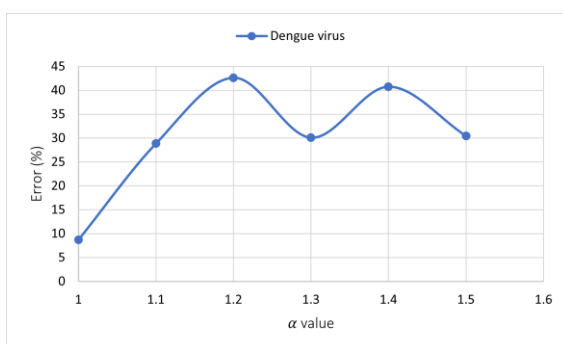
(vii) ผลการนับ PFU ของภาพ (v)

รูปที่ 4-22 การเปรียบเทียบความต่างระหว่างภาพที่ได้จากการใช้ $\alpha_{initial}$ และ $\alpha_{optimal}$ ด้วยภาพไวรัสโคโรนา โดยที่สีดำ-การนับที่ตรงกับผู้เชี่ยวชาญ สีแดง-ไม่ถูกนับ สีเขียว-นับไม่ถูกต้อง

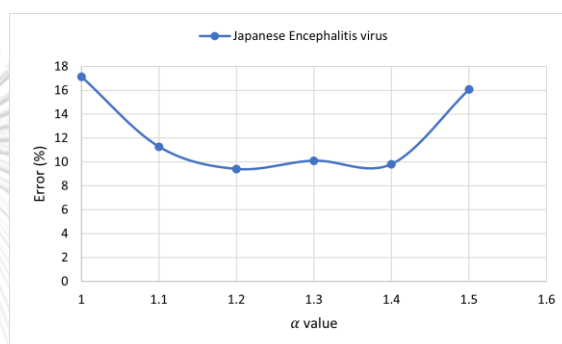
เมื่อทำการเปรียบเทียบผลลัพธ์ระหว่าง $\alpha_{initial}$ และ $\alpha_{optimal}$ ของไวรัสโคโรนาที่ย้อมสีด้วย crystal violet จะให้ผลดังรูปที่ 4-22 จะเห็นว่ารูปที่ 4-22.(vi) และรูปที่ 4-22.(vii) ให้ผลการนับที่ความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

4.4.4 การเปรียบเทียบระหว่างค่า α และร้อยละความคลาดเคลื่อน

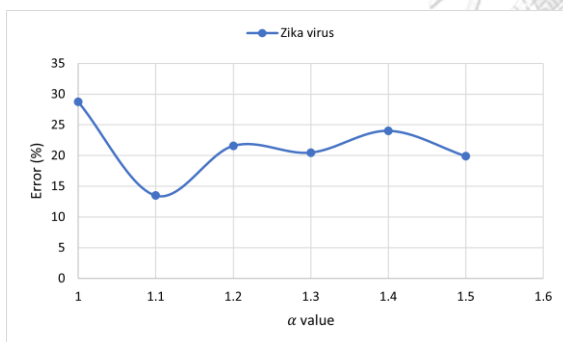
เพื่อพิจารณาผลกระทบของค่า α ต่อผลการนับ PFU จึงได้ทำการทดลองนับ PFU จากตัวอย่างของไวรัสแต่ละชนิดจำนวน 10 ภาพที่ค่า α ต่างกันได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า α และร้อยละความคลาดเคลื่อนของจำนวน PFU เฉลี่ยเป็นดังรูปที่ 4-23 จากผลการทดลองพบว่าค่า α ที่ให้ผลลัพธ์ความคลาดเคลื่อนต่ำจะอยู่ในช่วงประมาณ 1-1.2 สำหรับไวรัสที่ย้อมสีด้วย Neutral red c ในกรณีของไวรัสที่ย้อมสีด้วย Crystal violet ช่วงที่ให้ผลลัพธ์ความคลาดเคลื่อนน้อยจะอยู่ประมาณ 2-2.2 แสดงดังรูปที่ 4-23



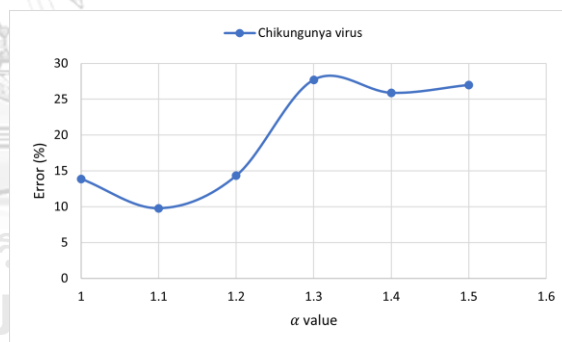
(i) ไวรัสไข้เลือดออก



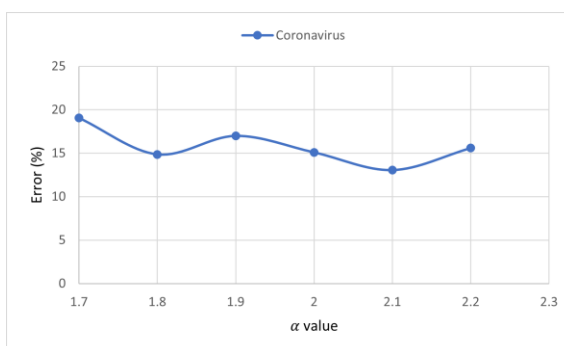
(ii) ไวรัสไข้สมองอักเสบ



(iii) ไวรัสไข้ซิกา



(iv) ไวรัสไข้ปวดข้ออยู่ถาวร

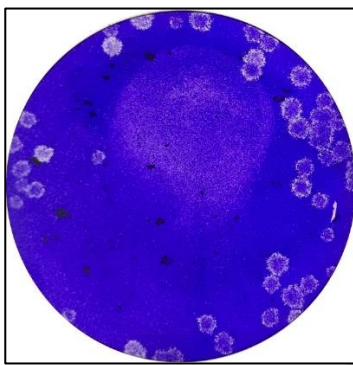


(v) ไวรัสโคโรนา

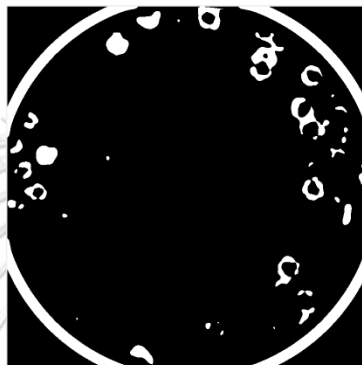
รูปที่ 4-23 ร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยของแต่ละค่า α เมื่อ ช่วง 1-1.5 สำหรับไวรัสที่ย้อมสีด้วย Neutral red และช่วง 1.7-2.2 สำหรับไวรัสที่ย้อมสีด้วย Crystal violet

4.5 ลักษณะภาพที่ประมวลผลได้ไม่ดี

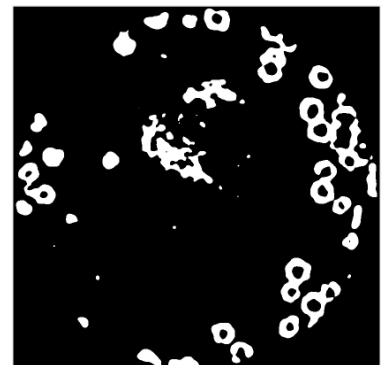
ภาพที่ไม่สามารถประมวลผลได้ดี คือภาพที่ PFU มีลักษณะรูปร่างตรงกลางเป็นรูหรือพื้นที่ขาดทำให้ได้ขนาดที่ไม่สมบูรณ์ (รูปที่ 4-24) กรณีที่ PFU และพื้นหลังมีสีที่ใกล้เคียงกันและขนาดเล็ก (รูปที่ 4-25) รวมถึง PFU ที่มีลักษณะฟุ้งกระจายและติดกันจนกลายเป็นพื้นที่ขนาดใหญ่ซึ่งทำให้ไม่เกิดส่วนเว้าแหว่งหรือขอบรูปร่าง นอกจากนั้นบริเวณพื้นหลังมีจุดขนาดเล็กและโดดเด่นจึงทำให้เกิดการนับเกินได้ (รูปที่ 4-26)



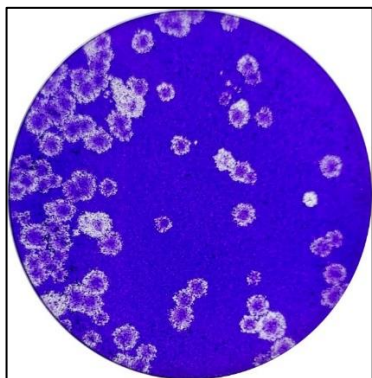
(i) ภาพต้นฉบับ



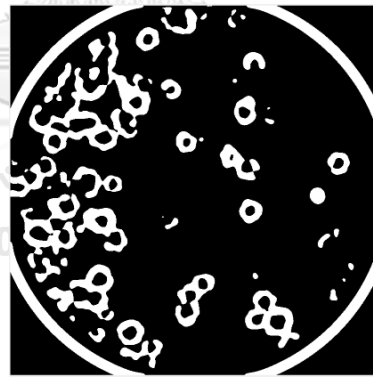
(ii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ
Y เท่ากับ 1.5 จาก ภาพ (i)



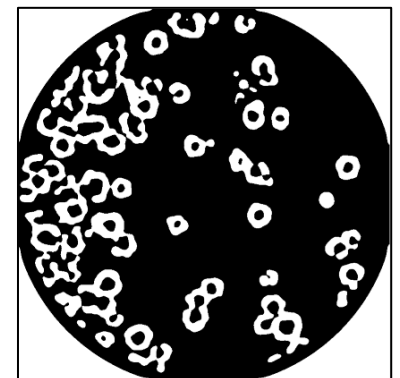
(iii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ
Y เท่ากับ 2 จากภาพ (i)



(iv) ภาพต้นฉบับ



(v) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ
Y เท่ากับ 1.5 จากภาพ (iv)

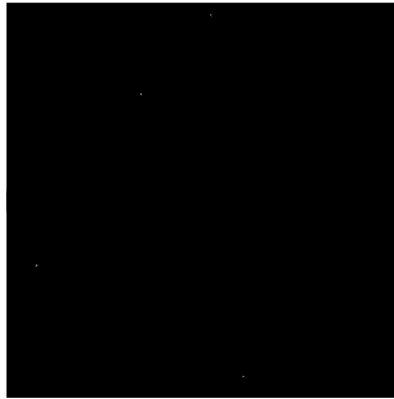


(vi) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ
Y เท่ากับ 2 จากภาพ (iv)

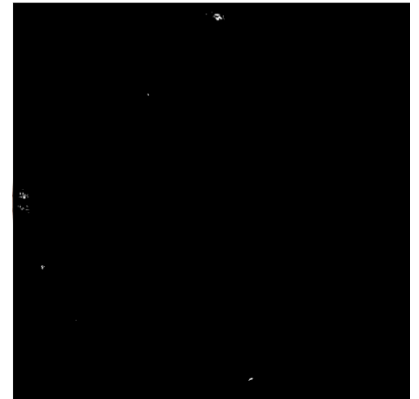
รูปที่ 4-24 ภาพที่ไม่สามารถแสดงผลตามลักษณะของ PFU ของไวรัสโคโรนา



(i) ภาพต้นฉบับ



(ii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ Z เท่ากับ 1.1 จากภาพ PFU มีขนาดเล็กเมื่อผ่านวงจรรอง PFU ทั้งหมดจะถูกกลบ

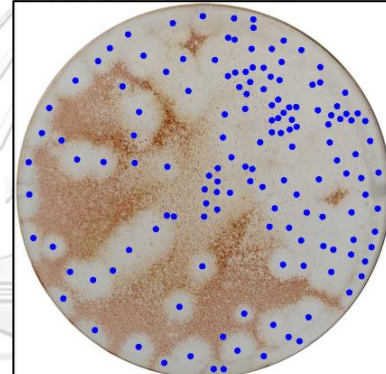


(iii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ Z เท่ากับ 2 จากภาพ PFU มีขนาดเล็กเมื่อผ่านวงจรรอง PFU ทั้งหมดจะถูกกลบ

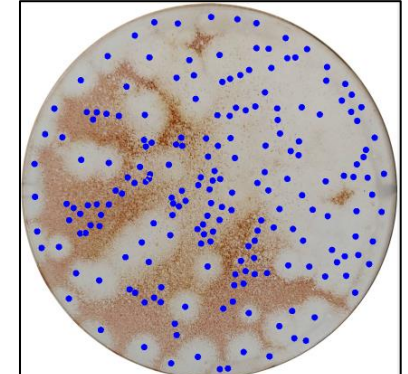
รูปที่ 4-25 ภาพที่ไม่สามารถแสดงผลตามลักษณะของ PFU ของไวรัสไข้ซิกา



(i) ภาพต้นฉบับ



(ii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ Z เท่ากับ 1.1 จากภาพ ซึ่ง PFU มีมากเกินกว่าจะนับ



(iii) ค่าสัมประสิทธิ์ของช่องสัญญาณ Z เท่ากับ 2 จากภาพ ซึ่ง PFU มีมากเกินกว่าจะนับ

รูปที่ 4-26 ภาพที่ไม่สามารถแสดงผลตามลักษณะของ PFU ของไวรัสไข้ปวดข้อยุงลาย

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยเรื่องการนับจำนวน PFU ในงานเพาะเชื้อ ด้วยกรรมวิธีแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ได้แก่ 1) สร้างกรรมวิธีการนับ PFU แบบกึ่งอัตโนมัติจากภาพงานเพาะเลี้ยงที่ได้จากกล้องถ่ายรูปทั่วไปที่ไม่มีการควบคุมแสง แต่ชอบหลุมติดกับขอบภาพทั้งสิ้น 2) ออกแบบวิธีเพื่อให้ผู้ใช้สามารถปรับปรุงกรรมวิธีที่นำเสนอเพื่อไปนับ PFU ที่ได้จากการย้อมสีหรือไวรัสประเภทอื่นนอกเหนือจากที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ในวิทยานิพนธ์นี้ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่ที่เป็นเครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูลภาพ ในการทดลองใช้ไวรัสย้อมด้วยสี Neutral red จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ 1) ไวรัสไข้เลือดออก 2) ไวรัสไข้สมองอักเสบ 3) ไวรัสไข้ซิกา 4) ไวรัสไข้วัดซ้อยุงลาย และ ไวรัสโคโรนา ย้อมด้วยสี Crystal violet โดยมีจำนวนข้อมูลชนิดละ 30 รูป จากศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล พารามิเตอร์ที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพ ได้แก่ ความแตกต่างระหว่างการนับด้วยมนุษย์และการนับด้วยคอมพิวเตอร์ ความแม่นยำ และความไว เมื่อพิจารณาว่า PFU และพื้นหลังคือผลบวก และผลลบ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสามารถสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ตามลำดับดังต่อไปนี้

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบกรรมวิธีการนับ PFU แบบกึ่งอัตโนมัติจากภาพงานเพาะเลี้ยงที่ได้จากกล้องถ่ายรูปทั่วไปที่ไม่มีการควบคุมแสง แต่ชอบหลุมติดกับขอบภาพทั้งสิ้นโดยอาศัยการปรับความสว่างพื้นหลังที่มีความสว่างต่างกันในช่วงสัญญาณของปริภูมิ CIE-XYZ ให้เท่ากันผ่านค่าถ่วงน้ำหนัก α ซึ่งเมื่อหาผลต่างของสองช่องสัญญาณแล้วจะได้ PFU ที่ชัดเจนและสามารถนับจำนวนได้ โดยการปรับออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ การกำหนดค่าถ่วงน้ำหนักให้เหมาะสมในแต่ละรูป ($\alpha_{optimal}$) และการกำหนดให้ทุกรูปมีค่าถ่วงน้ำหนักที่เท่ากัน (α_{fixed}) สามารถสรุปผลการทดลองของไวรัสทั้ง 5 ชนิดตามการปรับค่าถ่วงน้ำหนัก ได้ดังตารางที่ 5-1

ข้อจำกัด (Limitation) ในการทดลองนี้คือข้อมูลมาจากแหล่งเดียวและอ้างอิงผลการนับกับผู้นับเพียง 1 คนต่อ 1 ตัวอย่าง ไม่มีการพิจารณาความคลาดเคลื่อนในการนับระหว่างบุคคล

ผลประโยชน์ทางทฤษฎี (Theoretical contribution) คือการค้นหาพื้นที่ PFU จากภาพถ่ายงานหลุมที่ไม่มีการควบคุมแสงโดยอาศัยความสว่างของพื้นหลังที่ต่างกันในแต่ละช่องสัญญาณใน

ตารางที่ 5-1 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการนับ PFU เมื่อใช้ α ที่ปรับด้วยผู้ใช้เทียบกับการใช้ α คงที่

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ							
color	Virus type	α_{fixed} (%)			$\alpha_{optimal}$ (%)		
		Error	Precision	Sensitivity	Error	Precision	Sensitivity
Neutral red	Dengue virus	15.05	87.8	91.26	6.53	92.46	91.16
	Japanese Encephalitis virus	15.97	87.04	86.85	8.1	89.65	93.23
	Zika virus	34.09	77.63	73.17	17.42	90.15	73.26
	Chikungunya virus	13.83	92.78	82.85	7.52	93.01	89.97
Crystal violet	Coronavirus	26.48	80.92	96.64	14.72	86.33	96.86

ปริภูมิสี CIE-XYZ ซึ่งเมื่อนำสองช่องสัญญาณมาผ่านการส่ง (Mapping) ให้มีขนาดใกล้เคียงกันผ่านตัวแปรถ่วงน้ำหนัก α แล้วหาเป็นผลต่างของสองช่องสัญญาณจะทำให้บริเวณสีขาวของ PFU ที่มีความสว่างไม่แตกต่างกันในสองช่องสัญญาณถูกดึงออกมาได้เด่นชัด รวมถึงใช้กรรมวิธีหาค่าขีดเริ่มเปลี่ยนที่แตกต่างกัน ในกรณีที่ PFU บริเวณขอบและกลางจานหลุมมีความเด่นชัดแตกต่างกัน

ประโยชน์เชิงปฏิบัติ (Practical application) ของงานวิทยานิพนธ์คือ ช่วยลดความเครียดและความเหนื่อยล้าของผู้เชี่ยวชาญในการนับจำนวน PFU รวมถึงเพิ่มความเร็วในการนับ PFU ระบบที่นำเสนอไม่มีการติดตั้งอุปกรณ์เพิ่ม ทำให้ง่ายและสะดวกในการใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไปและระบบกึ่งอัตโนมัติที่ช่วยลดภาระงาน

5.2 อภิปรายผล

เนื่องจาก PFU มีความแตกต่างจากพื้นหลังไม่มากนักและรูปร่างไม่จำเป็นต้องมีลักษณะวงกลมอย่างเด่นชัด ส่งผลให้ในหลายงานวิจัยมีการควบคุมสิ่งแวดล้อม [6, 7, 12-14, 16] และอาศัยการปรับปรุงรูปภาพ (Preprocessing) ให้กับ PFU/CFU มีความเด่นชัดมากขึ้น [6, 7, 12-17] ทว่า

การควบคุมสิ่งแวดล้อมเป็นอุปสรรคต่อการนำระบบไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้เสนอกรรมวิธีกึ่งอัตโนมัติที่อาศัยการปรับค่าถ่วงน้ำหนัก α ช่วยเพิ่มความแตกต่างระหว่าง PFU และพื้นหลัง ทำให้สามารถนับ PFU ได้โดยไม่ต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมนอกจากการถ่ายภาพงาน หลุมให้ขอบจางติดขอบภาพทั้ง 4 ด้าน

การแบ่งพื้นที่ PFU และฉากหลังใช้การหาค่าขีดเริ่มเปลี่ยน แบบเฉพาะพื้นที่ เช่นเดียวกับ [14] รวมถึงการใช้ข้อมูลในปริภูมิสีมาแปลงเป็นข้อมูลความสว่าง ดังเช่นในงานของ [14, 16, 18] ส่งผลให้สามารถประยุกต์ระเบียบวิธีที่นำเสนอกับภาพสีย้อมอื่นได้ ในส่วนการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยนนั้นได้ออกแบบกรรมวิธีปรับพารามิเตอร์อัตโนมัติทำให้ใช้งานได้ง่ายขึ้น

การแปลง PFU ที่ติดกันในกรรมวิธีที่นำเสนอใช้กระบวนการวิธีสันปันน้ำร่วมกับการแปลงระยะทาง เช่นเดียวกับ [6, 7, 13, 14, 16-18] แต่ได้เพิ่มการแบ่ง PFU ที่ติดกันแต่มีขนาดเล็กด้วยการค้นหาพื้นที่ส่วนที่ยื่นออกมา ออกมาด้วย

จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่นำเสนอสามารถนำมาใช้นับ PFU ได้อย่างดีทั้งกับตัวอย่างที่ย้อมด้วยสี Neutral red และ Crystal violet ถึงแม้ว่ากรรมวิธีที่นำเสนอจะต้องปรับค่าถ่วงน้ำหนักเพื่อให้ใช้นับ PFU ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากการปรับค่าเพียงค่าเดียวทำให้การปรับไม่ยุ่งยากนัก

กรรมวิธีที่นำเสนอถูกออกแบบให้ใช้กับ PFU ที่มีสีขาวอยู่เป็นพื้นที่เดียวจึงไม่สามารถนำมาใช้กับ PFU ที่มีลักษณะฟุ้งกระจาย เช่น ไวรัสไข้วัดช้อยงลาย (รูปที่ 4-20) หรือไวรัสที่มีสีที่ค่อนข้างกลมกลืนกับพื้นหลัง เช่น ไวรัสไข้ซิกา (รูปที่ 4-19) รวมถึงไวรัสที่มีลักษณะเป็นพื้นว่างตรงกลาง เช่น ไวรัสโคโรนา (รูปที่ 4-18) ได้

5.3 จุดเด่น

1. ใช้อุปกรณ์ชนิดไหนก็ได้ในการถ่ายรูป เช่น โทรศัพท์หรือแท็บเล็ต
2. ไม่จำเป็นต้องติดตั้งอุปกรณ์อุปกรณ์เพื่อควบคุมแสง
3. สามารถค้นหา PFU บริเวณขอบหลุมที่มีลักษณะพื้นหลังเป็นสีขาวหรือสีเหลืองได้

5.4 ข้อจำกัด

1. รูปถ่ายต้องชัดกับขอบรูปทั้งสี่ด้าน

2. ระยะเวลาในการประมวลผลยาวนานกว่ากรรมวิธีของ Premsattham และคณะและ Claytor

3. ไม่สามารถใช้กับ PFU ที่มีขอบฟุ้งกระจายหรือรูตรงกลางได้

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในเชิงปฏิบัติ

1) การปรับค่าถ่วงน้ำหนัก (α) ขึ้นกับความแตกต่างของ PFU และพื้นหลังบริเวณขอบหลุมโดยพิจารณาจากถ้าพื้นหลังบริเวณขอบมีสีแดงไม่เข้มค่อนไปทางเหลืองหรือขาวซึ่ง PFU และพื้นหลังต่างกันน้อย โดยส่วนใหญ่หากปรับ α ให้มีค่าต่ำเกินไปจะหา PFU บริเวณนั้นไม่เจอ หากมากเกินไปจะนับพื้นหลังเป็น PFU

กรณี PFU ย้อมสี Neutral red มีค่า α อยู่ในช่วง 1-5 เพิ่มขึ้นทีละ 0.1

กรณี PFU ย้อมสี Crystal violet มีค่า α อยู่ในช่วง 1-3 เพิ่มขึ้นทีละ 0.1

2) ในกรณีที่ PFU บริเวณขอบหลุมเด่นชัดกว่าพื้นหลังมาก เช่น PFU ที่ย้อมสีด้วย Crystal violet แต่มีขนาดเล็กและชิดกับเส้นขอบหลุมและขอบภาพจนเกินไป เมื่อได้เพิ่มเส้นขอบวงกลมสีดำเพื่อแยก PFU จากพื้นที่ขอบแล้วอาจทำให้เส้นขอบวงกลมสีดำทับกับ PFU ได้ จึงควรถ่ายภาพให้ขอบหลุมไม่ชิดขอบภาพจนเกินไป

3) ระบบที่นำเสนอออกแบบภายใต้การกำหนดให้บริเวณโดยรอบของจานหลุมเป็นสีขาว

2. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1) ศึกษาการใช้ความหลากหลายของรูปภาพไวรัสชนิดอื่นและสีที่ใช้ย้อม รวมถึงขนาดรูปร่างที่แตกต่างจากงานวิจัยนี้

2) การปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ให้สามารถคำนวณค่าเพื่อใช้ทดลองแต่ละภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

3) เพิ่มจำนวนผู้เชี่ยวชาญที่จะมานับ PFU เป็นค่ามาตรฐาน

บรรณานุกรม

1. Rossi, C.A., et al., *Evaluation of ViroCyt® Virus Counter for rapid filovirus quantitation*. *Viruses*, 2015. 7(3): p. 857-872.
2. Baron, E.J., et al., *Evaluation of the Biomic V3 microbiology system for identification of selected species on BBL CHROMagar orientation agar and CHROMagar MRSA medium*. *Journal of clinical microbiology*, 2008. 46(10): p. 3488-3490.
3. Katzelnick, L.C., et al., *Viridot: An automated virus plaque (immunofocus) counter for the measurement of serological neutralizing responses with application to dengue virus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2018. 12(10): p. e0006862.
4. Quentin, G., *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. *PloS one*, 2013. 8(2): p. e54072.
5. Moorman, M. and A. Dong. *Automated viral plaque counting using image segmentation and morphological analysis*. in *2012 IEEE International Symposium on Multimedia*. 2012.
6. Premsattham, P., et al., *Development of Automated Platform for Image Capturing and Counting Algorithm for Viral Plaque*, in *Proceedings of the 2019 3rd International Conference on Virtual and Augmented Reality Simulations*. 2019, ICVARS: New York. p. 52-56.
7. Claytor, K. *Development and implementation of an efficient automated cell colony and plaque counter*. 2008. University of Illinois Internal Physics Publication.
8. Cacciabue, M., A. Currá, and M.I. Gismondi. *ViralPlaque: a Fiji macro for automated assessment of viral plaque statistics*. in *PeerJ*. 2019.
9. Bewes, J., N. Suchowerska, and D. McKenzie, *Automated cell colony counting and analysis using the circular Hough image transform algorithm (CHITA)*. *Physics in Medicine & Biology*, 2008. 53(21): p. 5991-6008.
10. Barber, P.R., et al. *An automated colony counter utilising a compact Hough*

- transform*. in *Proceedings of Medical Image Understanding and Analysis*. 2000. MIUA2000.
11. Busra, K., et al. *Counting bacteria colonies based on image processing methods*. in *2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO)*. 2019. IEEE.
 12. Martinez, J.C.E., et al., *Nondestructive technique for bacterial count based on image processing*. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 2016. 1(1): p. 1-6.
 13. Chiang, P.-J., et al., *Automated counting of bacterial colonies by image analysis*. *Journal of microbiological methods*, 2015. 108: p. 74-82.
 14. Brugger, S.D., et al., *Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates*. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0033695, 2012. 7(3).
 15. Zhi, f.H. *Automated counting and identification of cell colonies based on distance transform and progressive erosion*. in *International Conference on Advanced Computer Science and Electronics Information (ICACSEI 2013)*. 2013.
 16. Kaur, U.N. and R. Goyal, *Computational approach to count bacterial colonies*. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 2012. 4(2): p. 364.
 17. Liu, A., et al., *Adaptive ideal image reconstruction for bacteria colony detection*, in *Information Technology and Agricultural Engineering*. 2012, Springer. p. 353-360.
 18. Zhang, C., et al. *An automated bacterial colony counting system*. in *2008 IEEE international conference on sensor networks, ubiquitous, and trustworthy computing (sutc 2008)*. 2008. IEEE.
 19. Fairman, H.S., M.H. Brill, and H. Hemmendinger, *How the CIE 1931 color-matching functions were derived from Wright -Guild data*. *Color Research & Application: Endorsed by Inter-Society Color Council, The Colour Group (Great Britain), Canadian Society for Color, Color Science Association of Japan, Dutch Society for the Study of Color, The Swedish Colour Centre Foundation, Colour Society of Australia, Centre Français de la Couleur*, 1997. 22(1): p. 11-23.
 20. Schanda, J., *Colorimetry: understanding the CIE system*. 2007: John Wiley &

Sons.

21. Merkus, D.H.G., *Particle size measurements: fundamentals, practice, quality*. 2009, Springer Science & Business Media: Pijnacker. p. 14-16.
22. Maurer, C., R. Qi, and V. Raghavan, *A linear time algorithm for computing exact Euclidean distance transforms of binary images in arbitrary dimensions*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2003. 25(2): p. 265-270.
23. Rosenfeld, A. and J. Pfaltz, *Sequential operations in digital picture processing*. Journal of the Association for Computing Machinery, 1966. 13(4): p. 471-494.
24. Gonzalez, R.C., R.E. Woods, and S.L. Eddins, *Digital Image processing using MATLAB*. 2004, New Jersey: Pearson Prentice Hall.
25. Tan, X., et al., *Green channel guiding denoising on bayer image*. The Scientific World Journal, 2014.

ภาคผนวก ก. ผลการนับของกรรมวิธีที่นำเสนอ

ผลการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุดใหญ่ตามสีย้อมและแยกย่อยตามชนิดของไวรัสดังนี้


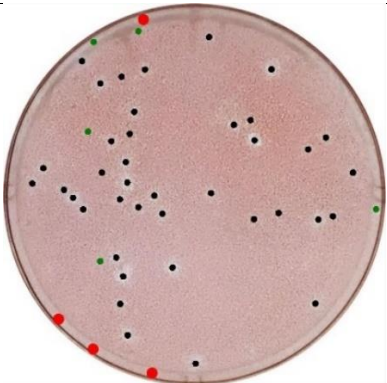
1. PFU ย้อมด้วยสี Neutral red
 - 1.1 ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)
 - 1.2 ไวรัสไข้สมองอักเสบ (Japanese Encephalitis virus)
 - 1.3 ไวรัสไข้ซิกา (Zika virus)
 - 1.4 ไวรัสไข้ปวดข้อยุ่งลาย (Chikungunya virus)
2. PFU ย้อมด้วยสี Crystal violet
 - 2.1 ไวรัสโคโรนา (Coronavirus)


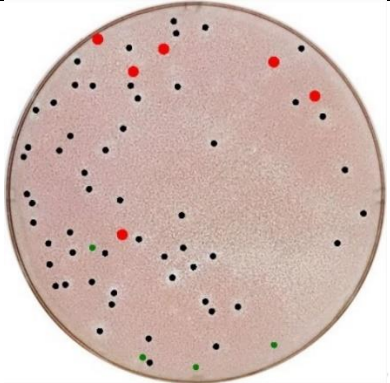

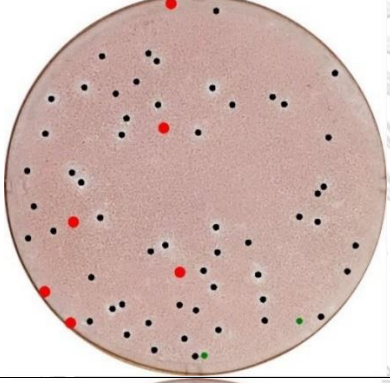

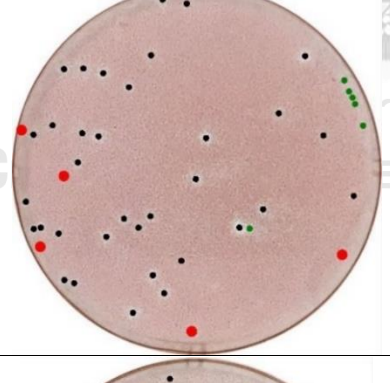

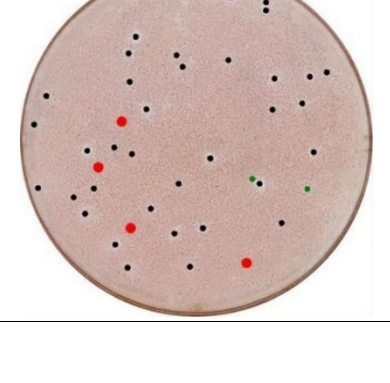
สีของผลการนับแบ่งออกเป็นดังนี้


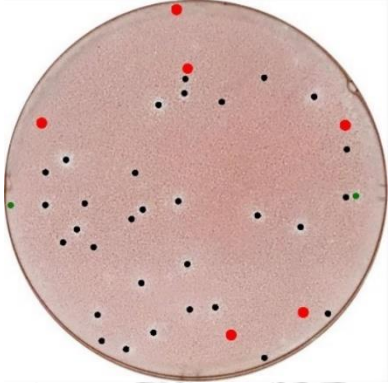

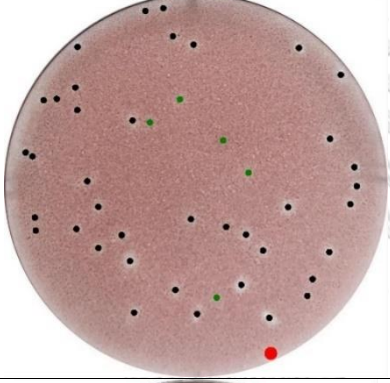

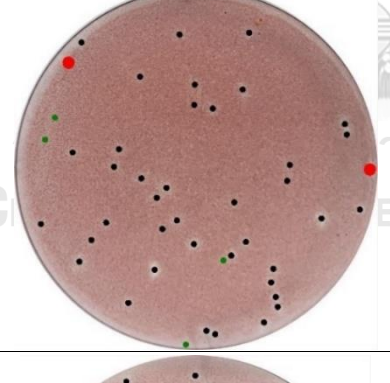

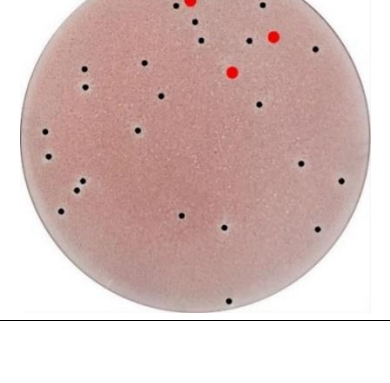
1. สีดำแสดง PFU ที่นับได้ถูกต้องและคิดเป็นจำนวนเท่ากับ TP (True positive)
2. สีเขียวแสดงตำแหน่งที่ระบบนับพื้นหลังเป็น PFU และคิดเป็นจำนวนเท่ากับ FP (False positive)
3. สีแดงแสดงตำแหน่ง PFU ที่ระบบพิจารณาผิดกลายเป็นพื้นหลังและคิดเป็นจำนวนเท่ากับ FN (False negative)


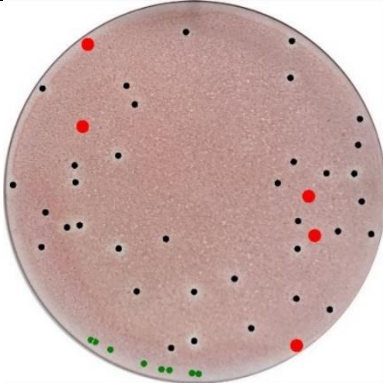

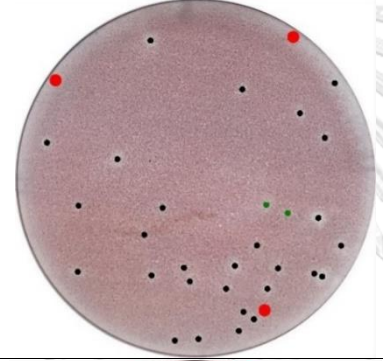

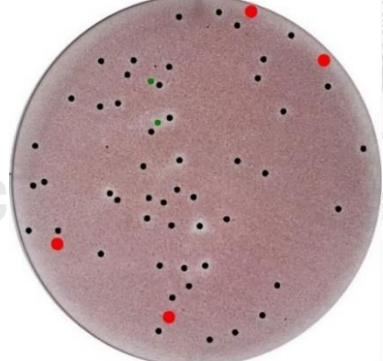

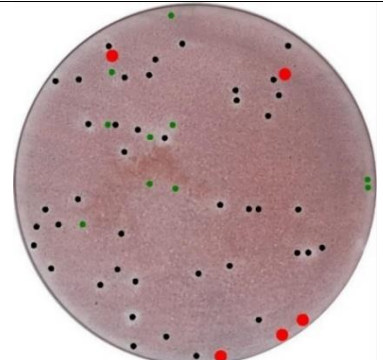
* สำหรับ PFU ที่ถูกนับซ้ำจะถูกระบุไว้ในค่า Over segment


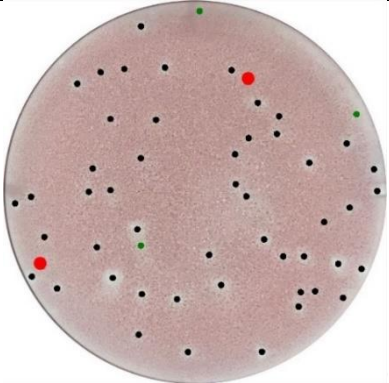

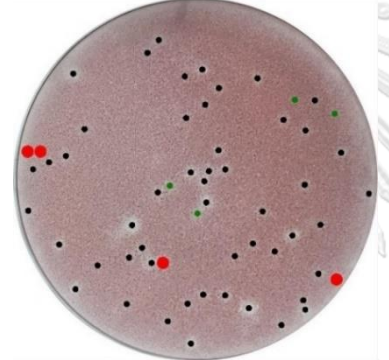

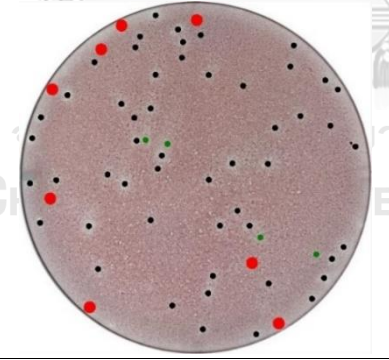

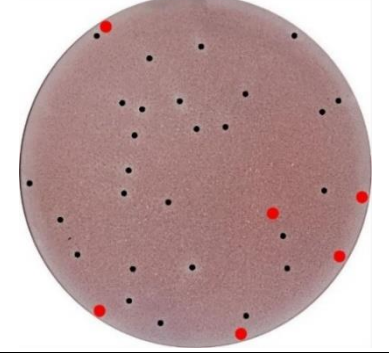
- ก.1 PFU ย้อมสี Neutral red
 - ก.1.1 ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus)


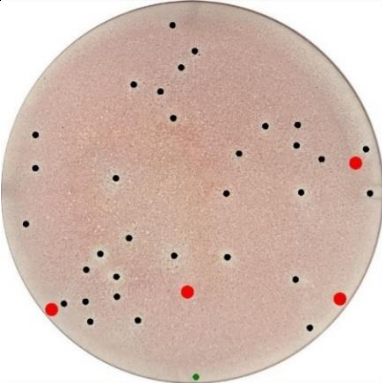

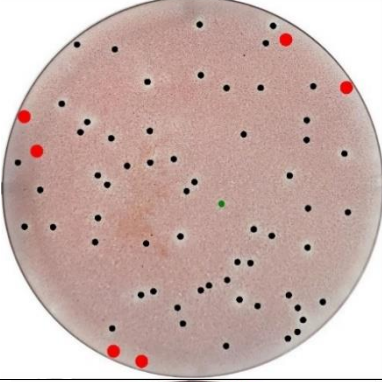

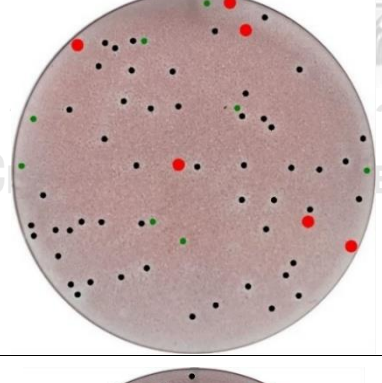

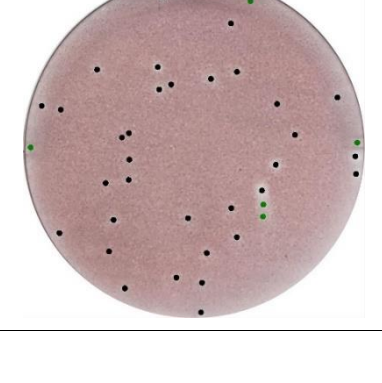
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	43	39	5	4	0


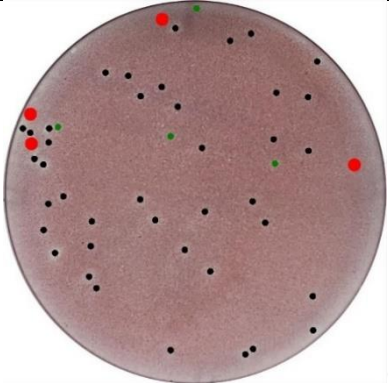

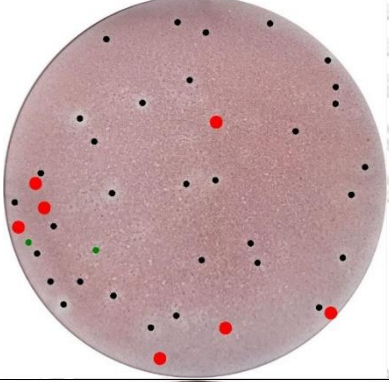
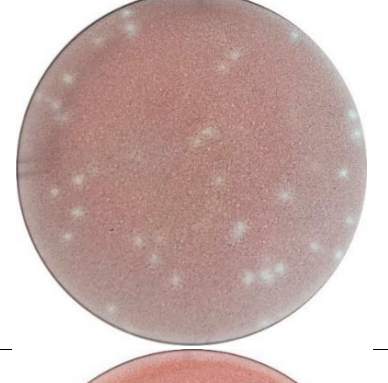
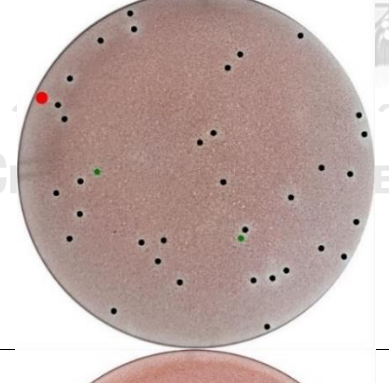

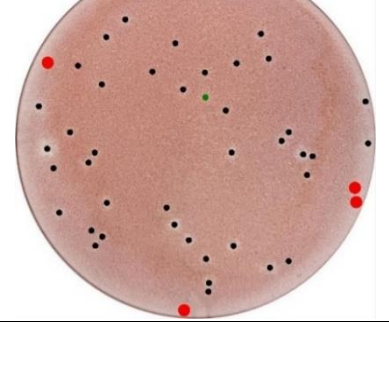
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	61	55	4	6	0
		1.1	62	55	2	6	0
		1	39	34	6	5	0
		1	39	35	2	4	1


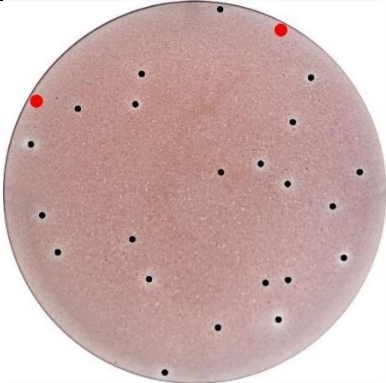
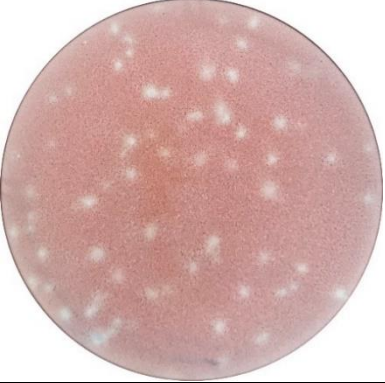
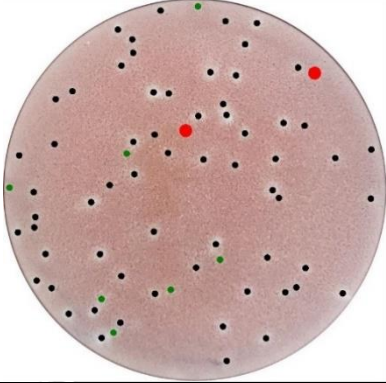

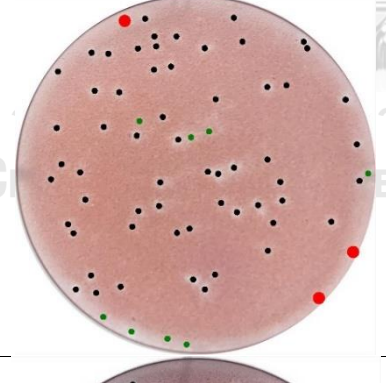

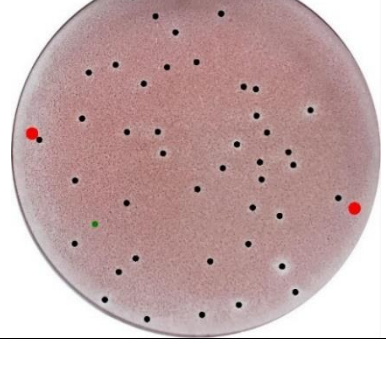
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1	37	31	2	6	0
		1.1	41	39	5	1	0
		1.1	42	39	4	2	0
		1.2	29	26	0	3	0


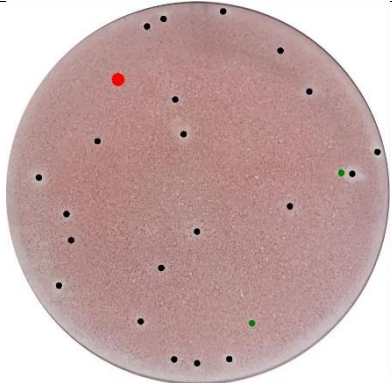
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	40	35	8	5	0
		1.3	31	28	2	3	0
		1.2	53	49	2	4	1
		1.2	45	40	10	5	2

Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	52	49	3	2	0
		1.2	55	51	4	4	0
		1.2	60	52	4	8	0
		1.2	33	27	0	6	0


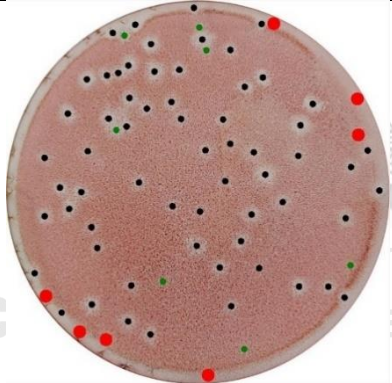

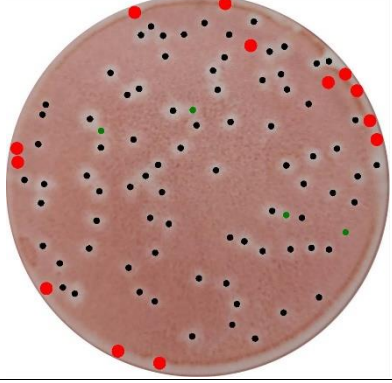
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	36	32	1	4	0
		1.2	64	58	1	6	1
		1.2	56	50	8	6	1
		1.2	33	33	5	0	1


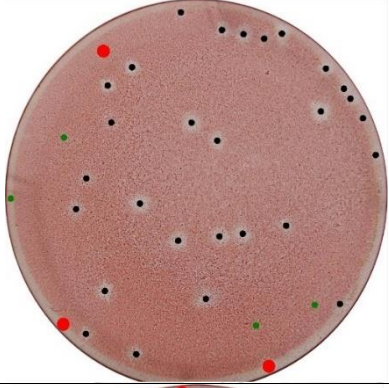

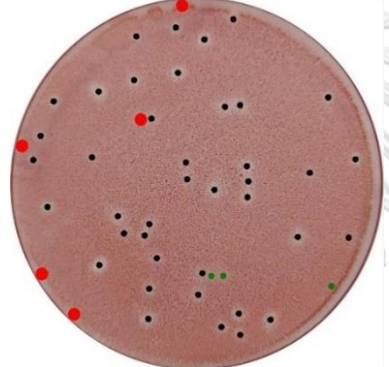

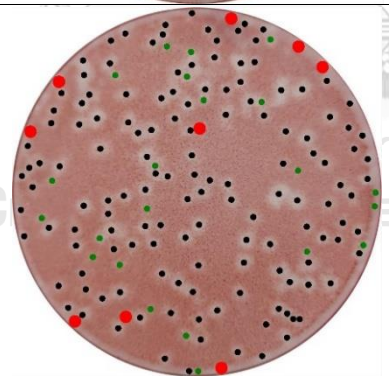

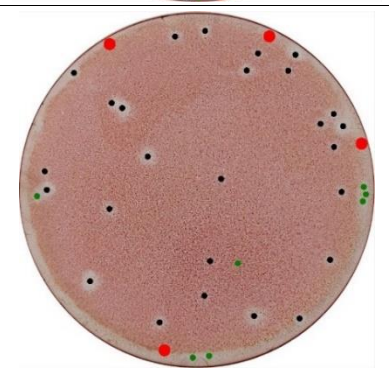
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	44	40	4	4	0
		1.1	39	32	2	7	0
		1.1	35	34	2	1	0
		1	44	40	1	4	0


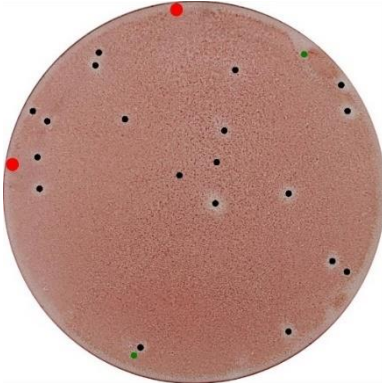

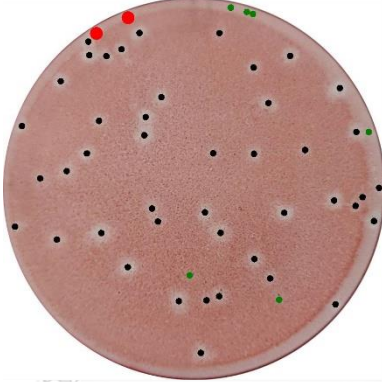

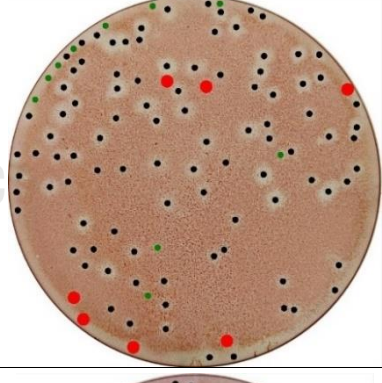

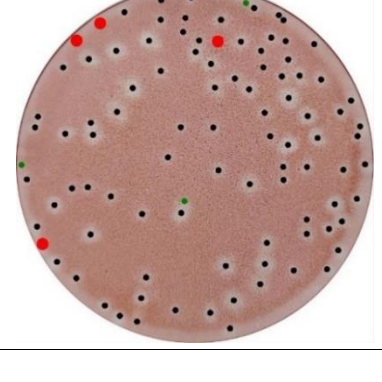
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	24	22	0	2	0
		1.2	64	62	7	2	1
		1.1	62	58	8	3	1
		1.1	44	42	1	2	0


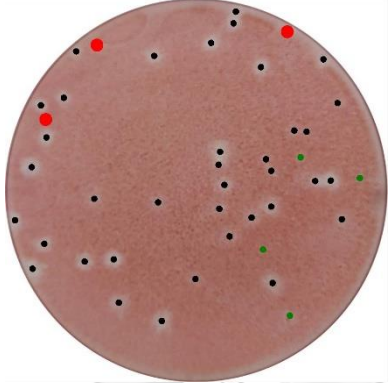

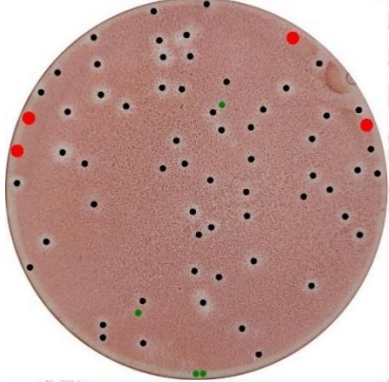

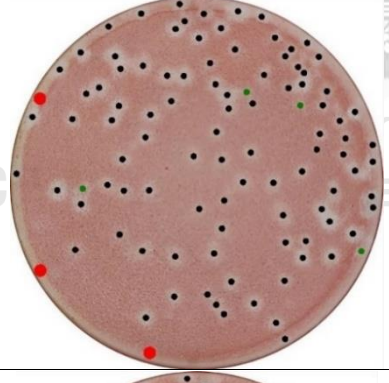

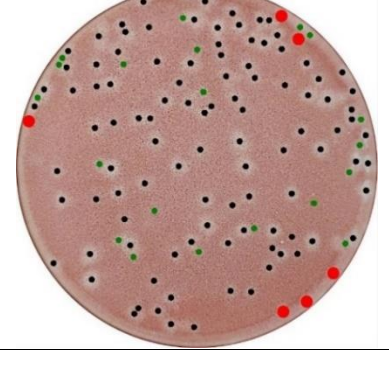
Dengue virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	22	21	2	1	0






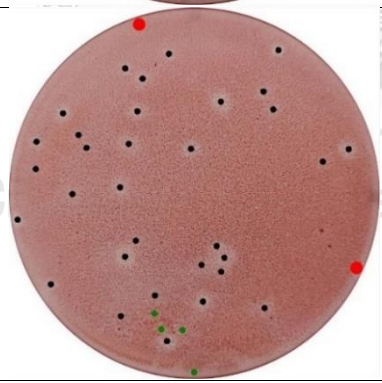

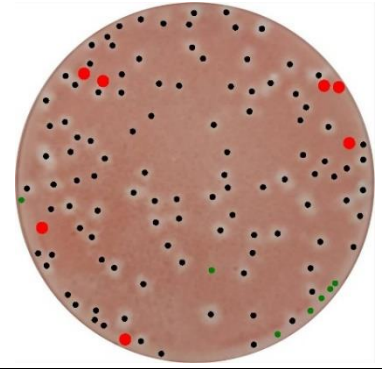
ก.1.2 ไวรัสไข้สมองอักเสบ (Japanese Encephalitis virus)


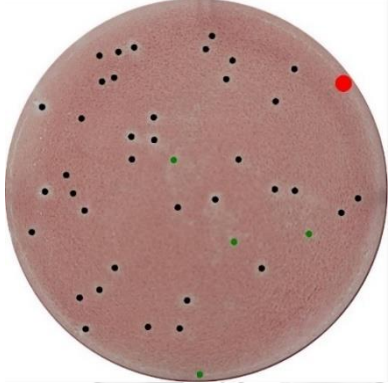

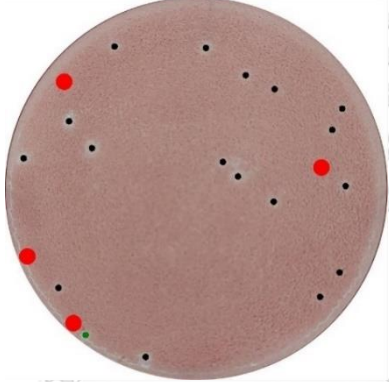

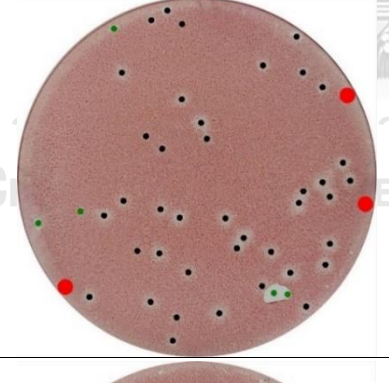

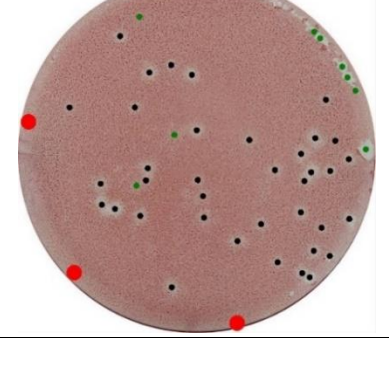
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	69	62	7	7	0
		1.2	92	79	4	13	1


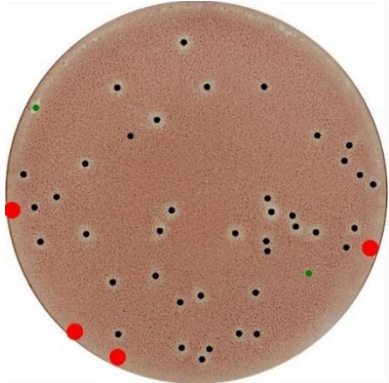

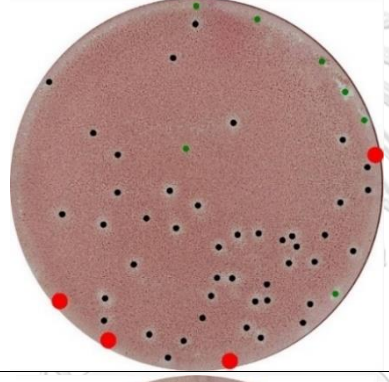

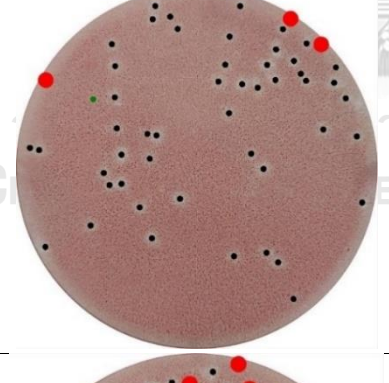

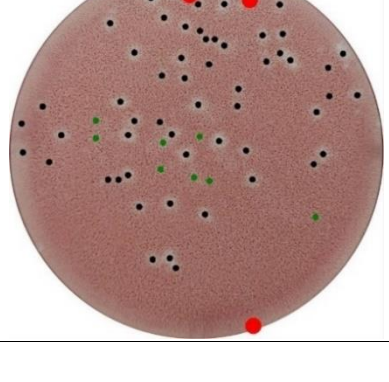
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	32	28	4	3	0
		1.2	44	39	3	5	1
		1.2	145	133	22	9	6
		1.2	30	26	7	4	0


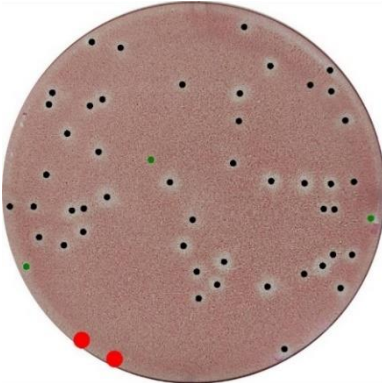

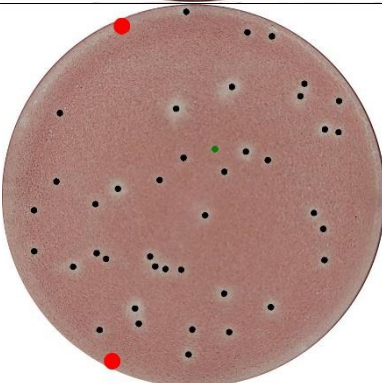
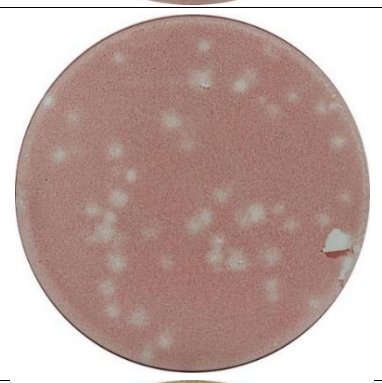
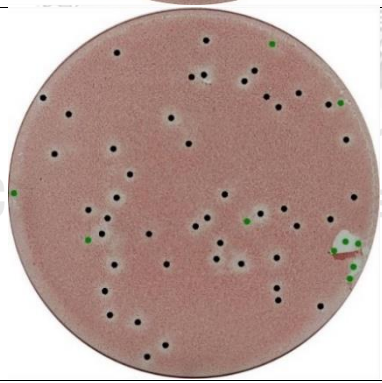
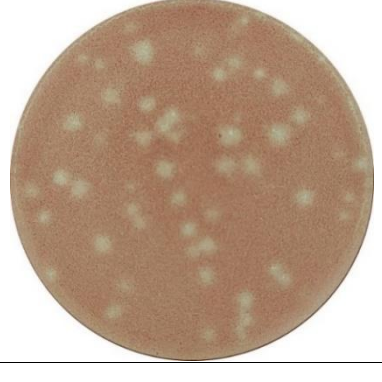
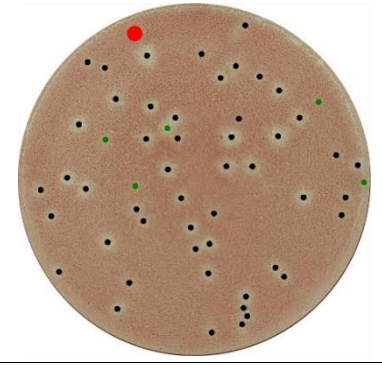
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	21	19	2	2	0
		4	45	43	6	2	1
		5	105	96	10	7	0
		1.2	95	91	3	4	1

Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		4	39	36	4	3	1
		1.2	64	60	4	4	0
		4	96	93	4	3	3
		4	105	98	20	6	5


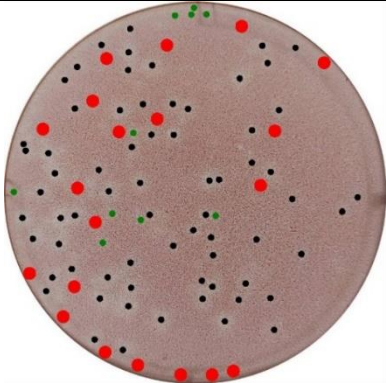

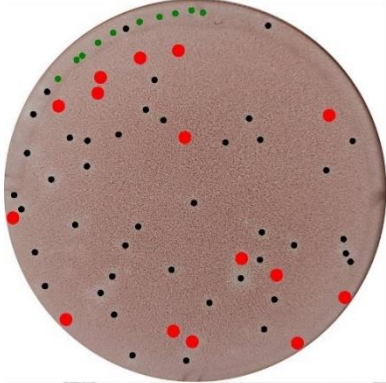

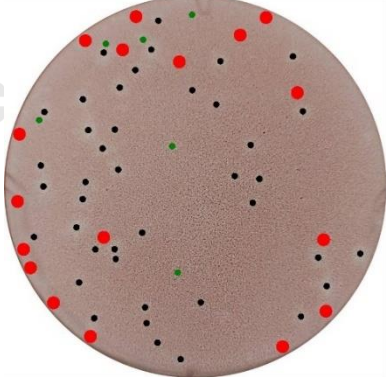
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	12	12	3	0	0
		2	24	24	4	0	2
		4	33	31	4	2	1
		5	118	105	7	7	1


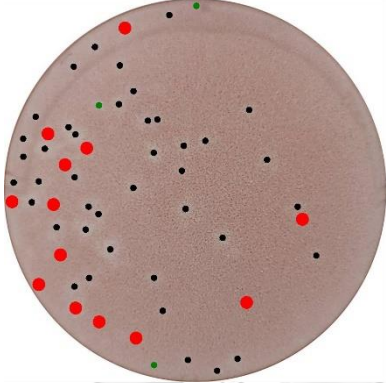

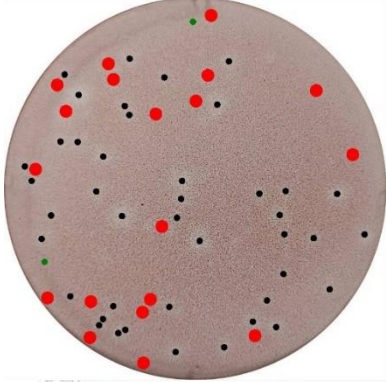
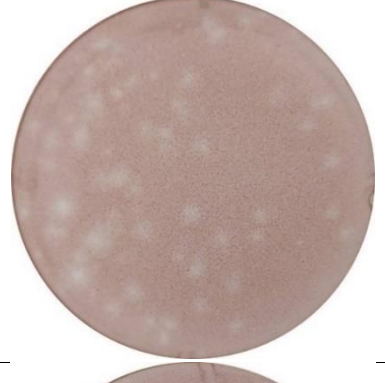
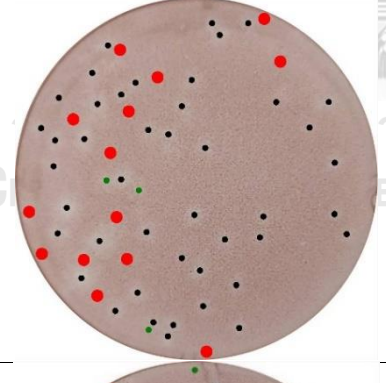

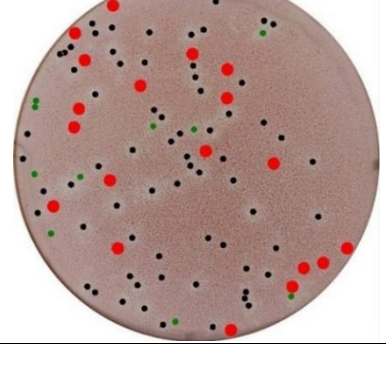
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	38	37	4	1	0
		1.1	21	17	1	4	0
		2	43	40	5	3	0
		1.2	39	36	9	3	1


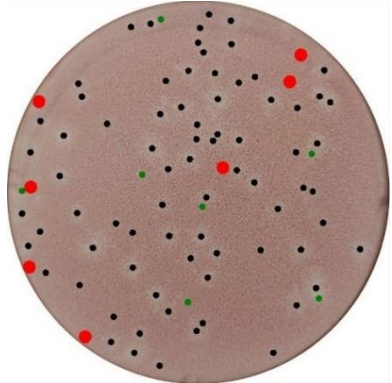

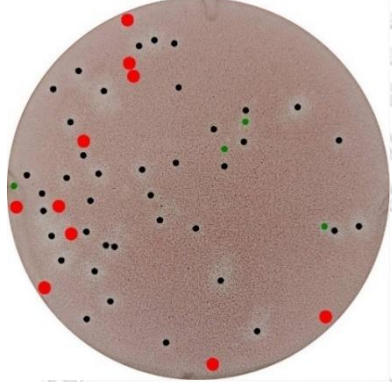
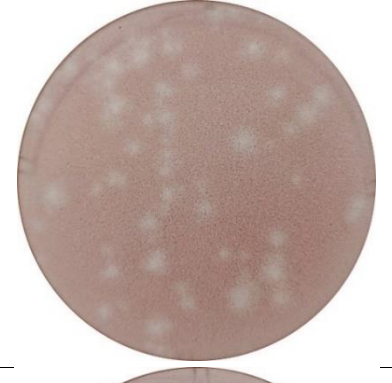
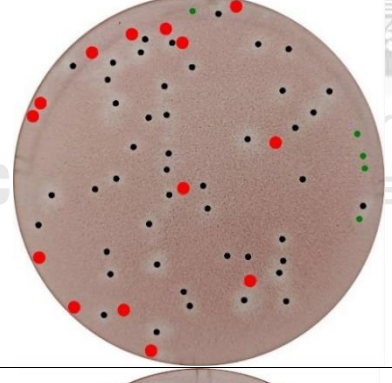

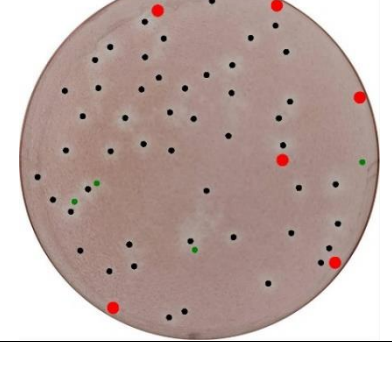
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	43	39	2	4	1
		1.2	48	44	7	4	0
		1.2	51	48	1	3	1
		2	56	52	8	4	4


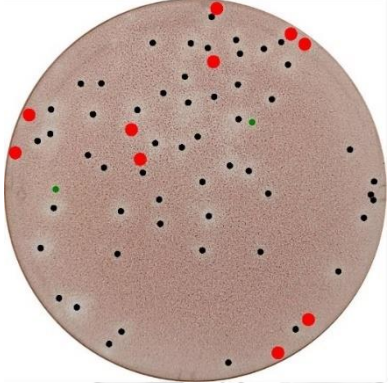

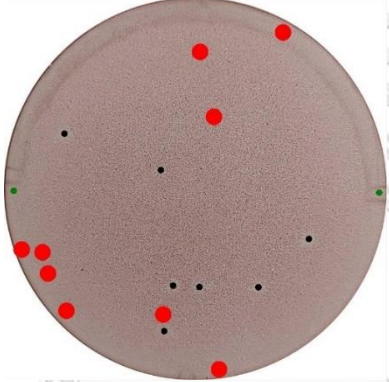

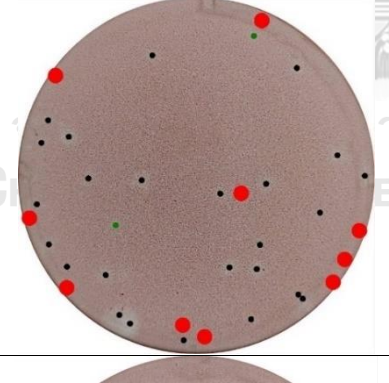

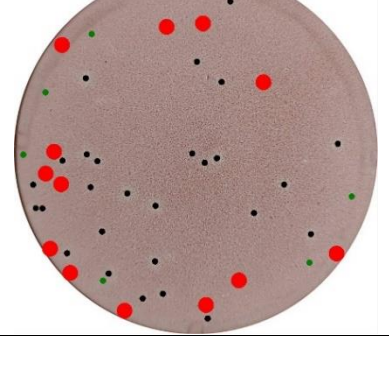
Japanese Encephalitis virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	49	47	3	2	0
		1.2	42	39	1	2	1
		1.2	44	44	10	0	1
		2	50	49	5	1	1




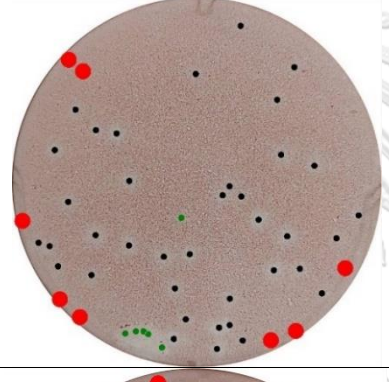

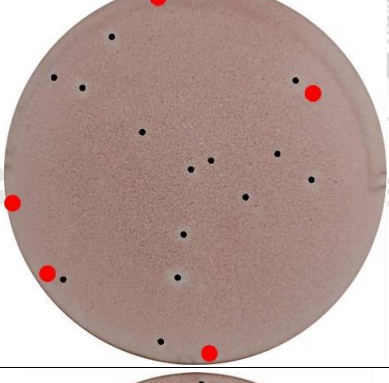

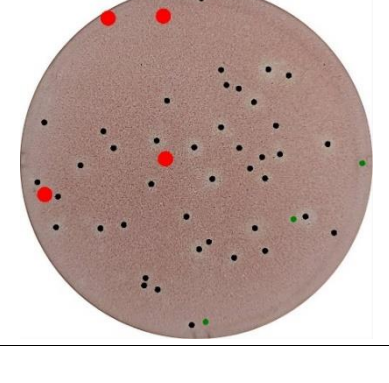
ก.1.3 ไวรัสไข้ซิกา (Zika virus)


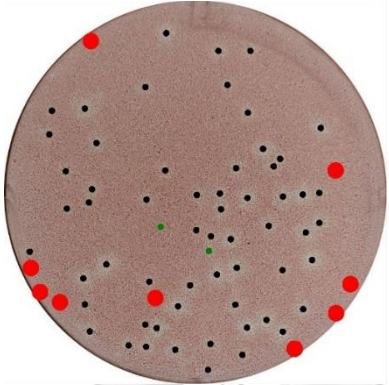

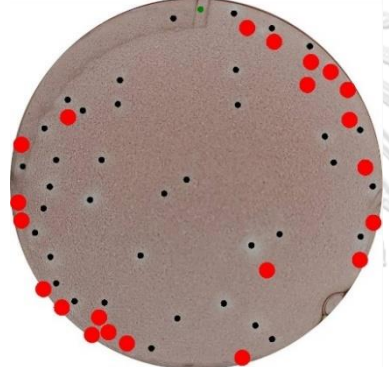

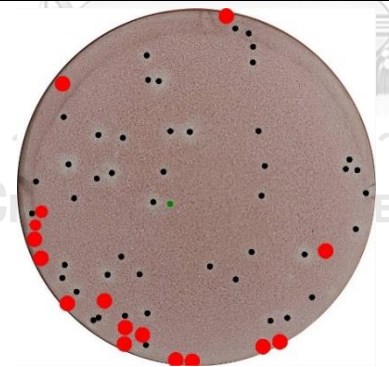

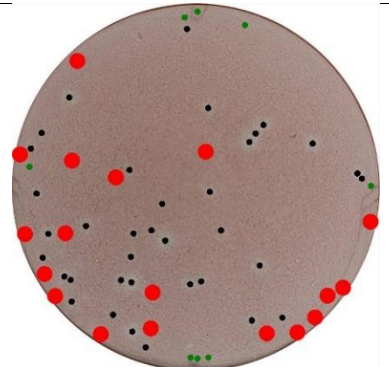
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	86	66	10	20	2
		1.1	56	41	10	15	1
		1.1	57	40	6	17	1


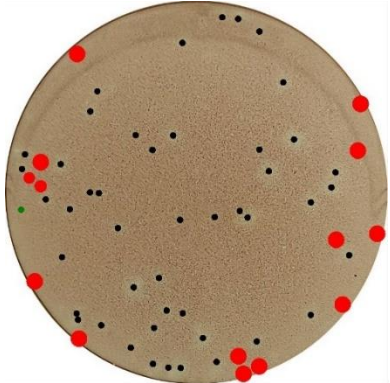

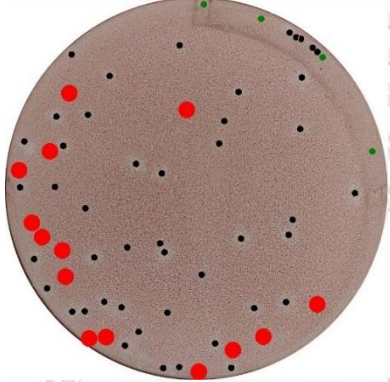

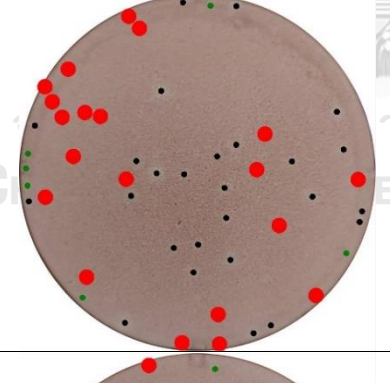

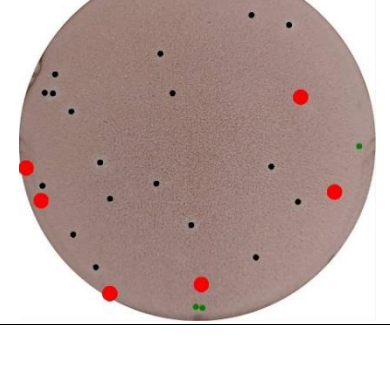
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	54	41	3	13	0
		1.2	58	39	2	19	3
		1.5	58	44	3	14	0
		1.1	83	62	11	19	5


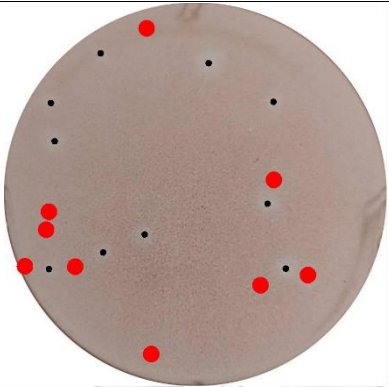

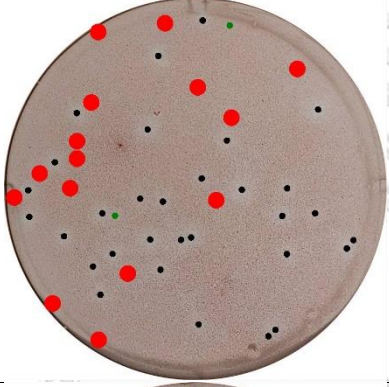

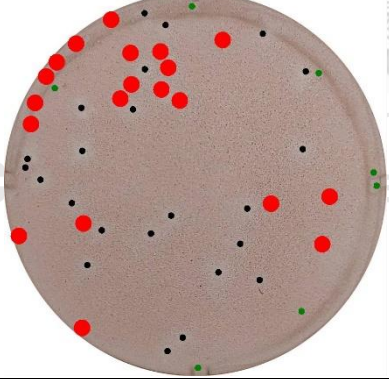
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	81	74	7	7	2
		1.2	48	38	4	10	1
		1.1	61	46	5	14	0
		1.5	55	49	4	6	0

Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	63	52	2	10	1
		1.2	16	7	2	9	0
		1.1	33	22	2	10	2
		1.2	40	27	6	13	0


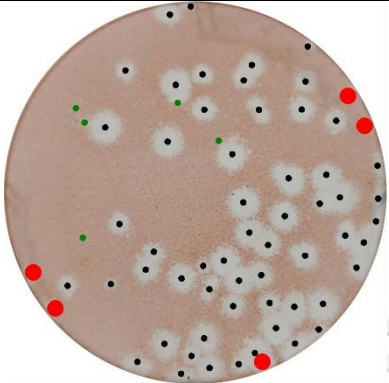

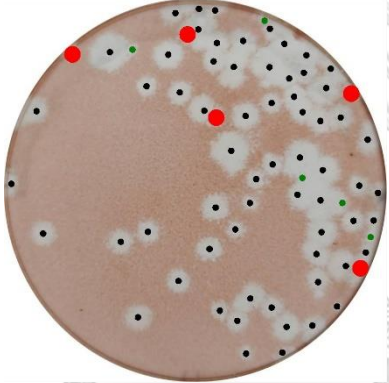

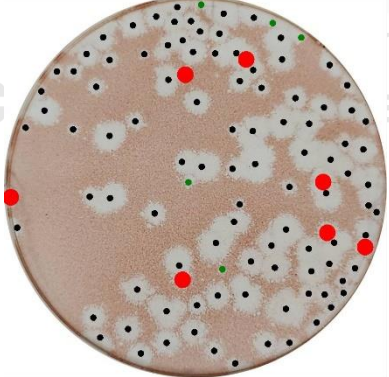
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1	6	6	0	0	0
		1.3	45	37	6	8	1
		1.1	19	14	0	5	0
		1.3	44	40	3	4	1


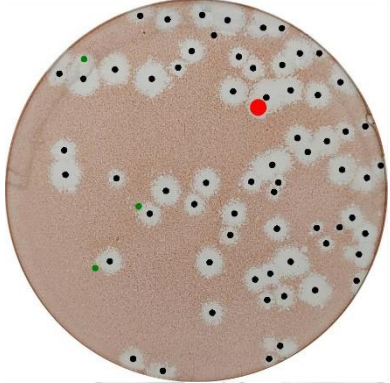

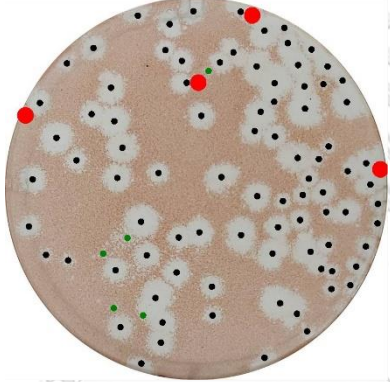

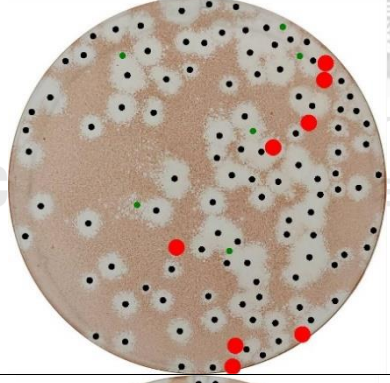

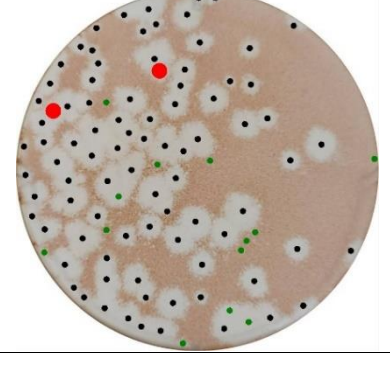
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	67	58	2	9	1
		1.1	61	37	1	22	0
		1.1	61	44	1	16	1
		1.2	52	34	8	18	2


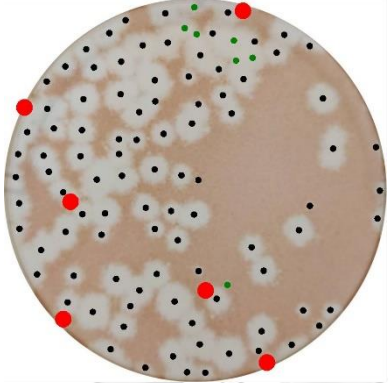

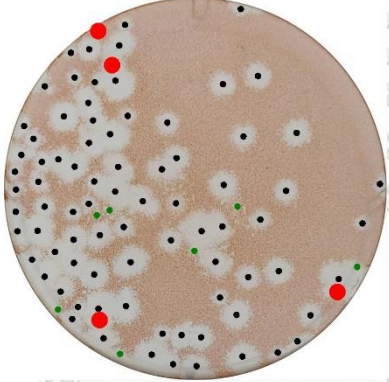

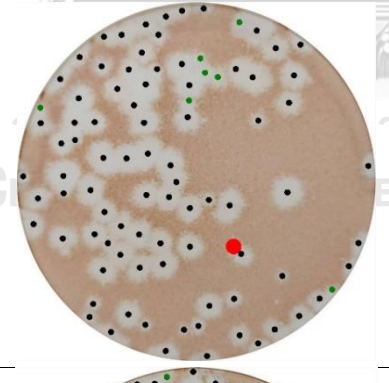

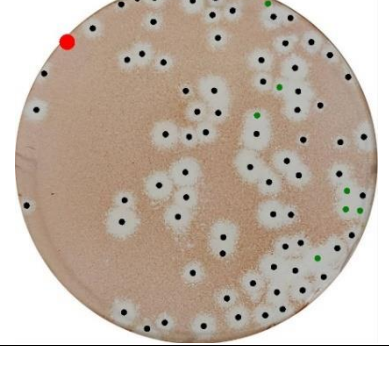
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.6	59	44	1	14	1
		5	57	40	4	14	4
		2	45	25	6	20	1
		2.5	24	17	4	7	1


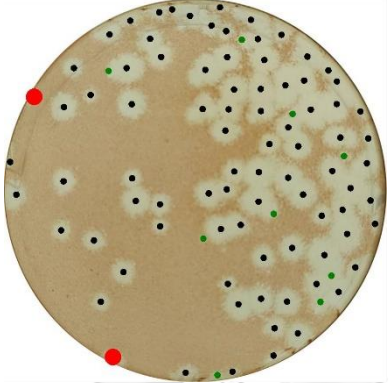

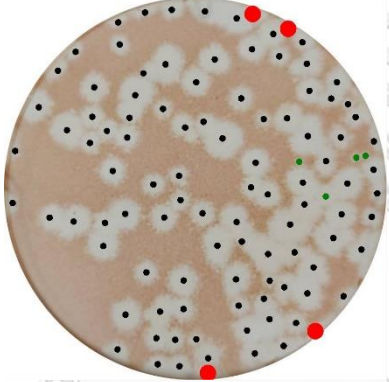

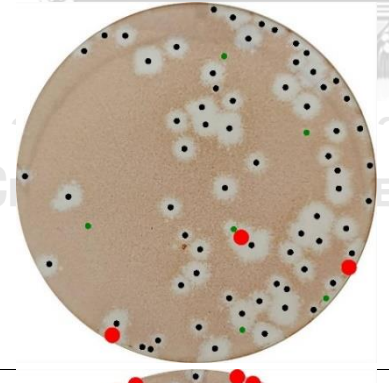

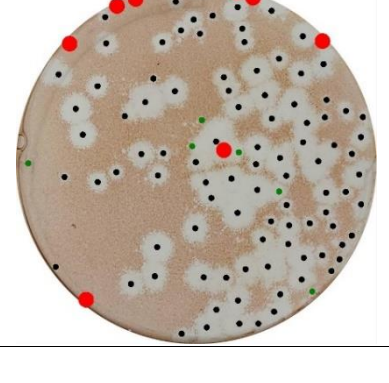
Zika virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.3	19	10	0	9	0
		1.3	44	29	2	15	2
		1.4	43	22	7	20	1


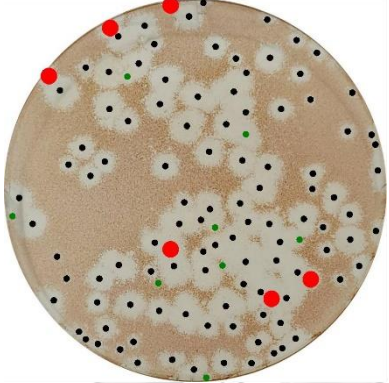

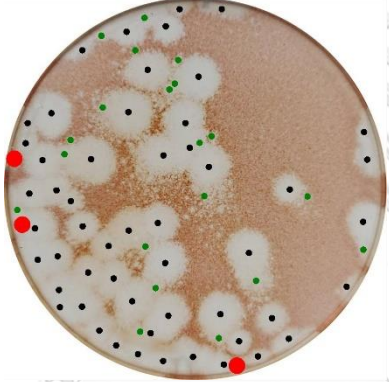

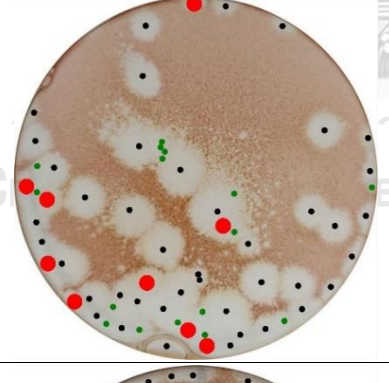

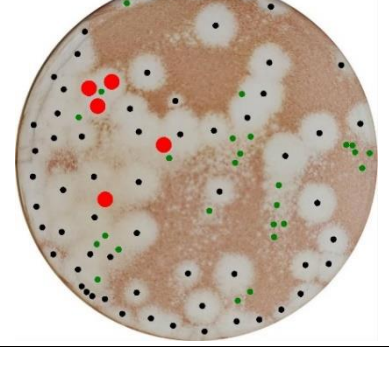
ก.1.4 ไวรัสไข้ปวดข้อยุ่งลาย (Chikungunya virus)


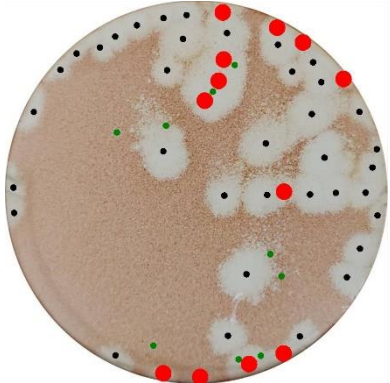

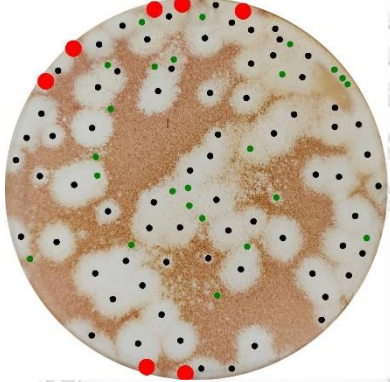

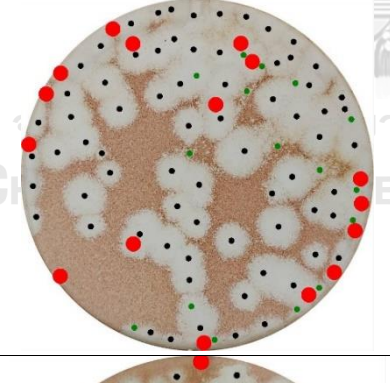

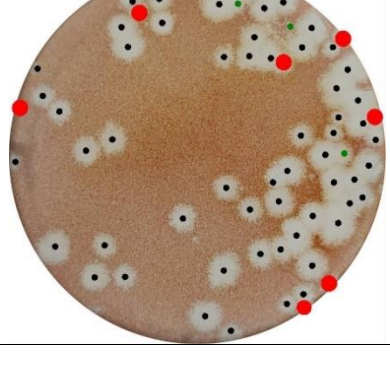
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1	65	57	5	5	0
		1	71	64	5	5	0
		1.1	110	98	5	7	0


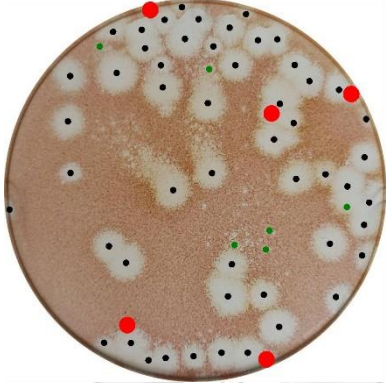


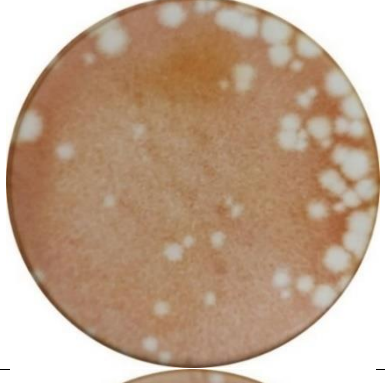
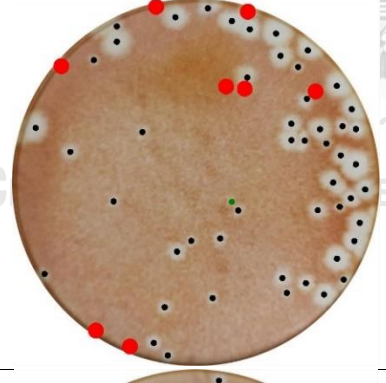

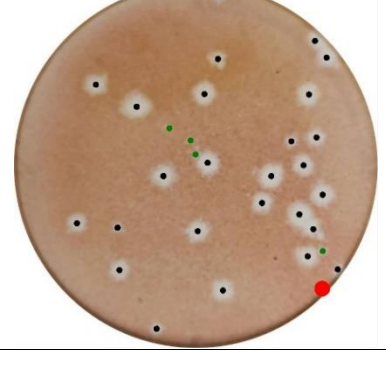
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	68	64	3	1	1
		1.1	93	87	5	4	0
		1.1	112	100	6	8	4
		1.1	91	84	13	2	2




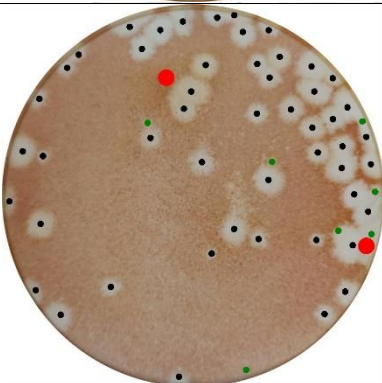

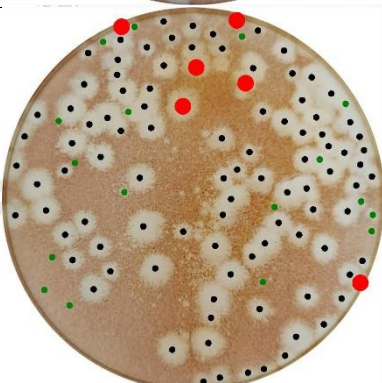
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	107	95	7	6	0
		1	88	81	7	4	0
		1.2	86	84	7	1	0
		1.1	77	75	8	1	0

Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.3	87	83	9	2	0
		1	107	98	4	4	0
		1	67	64	6	3	3
		1.1	106	94	6	8	1

Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	114	102	8	6	3
		1	59	52	20	3	1
		1.1	48	38	16	9	3
		1.1	65	60	26	5	2

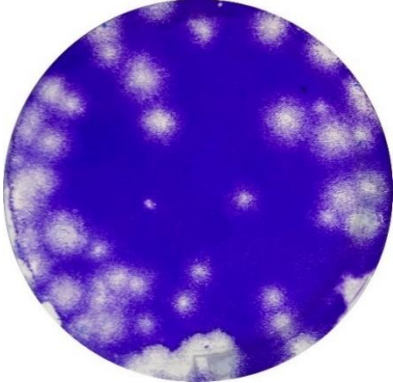
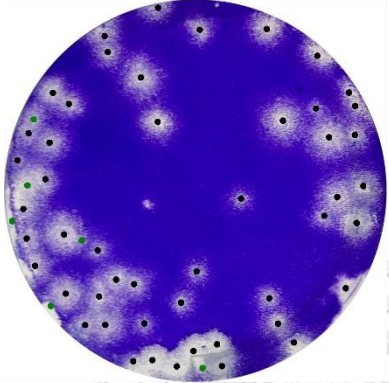
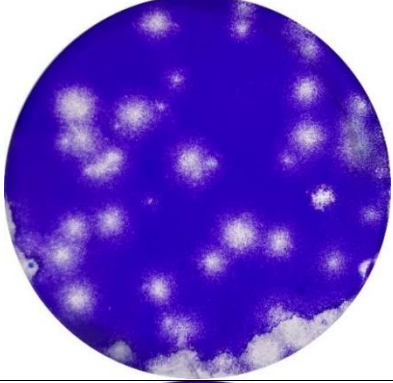
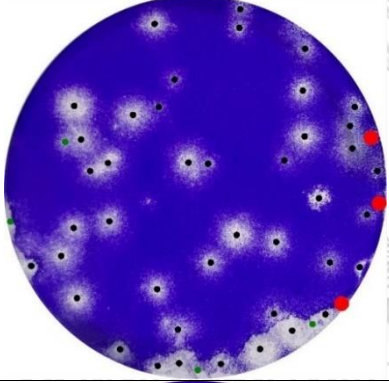
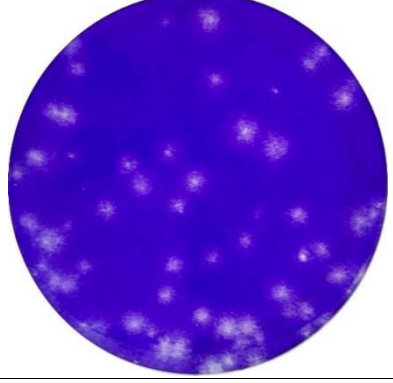
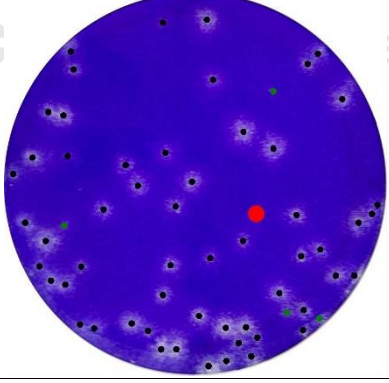
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1	49	36	9	12	0
		1.3	77	70	24	7	1
		1	87	69	16	16	2
		1.2	66	58	3	8	0


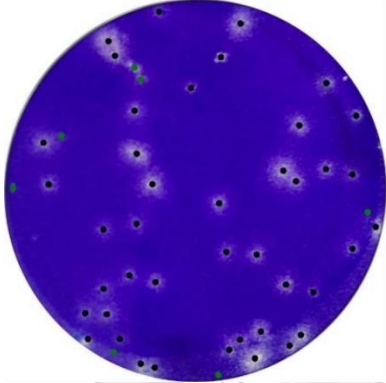

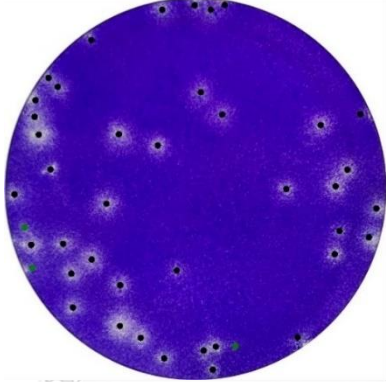
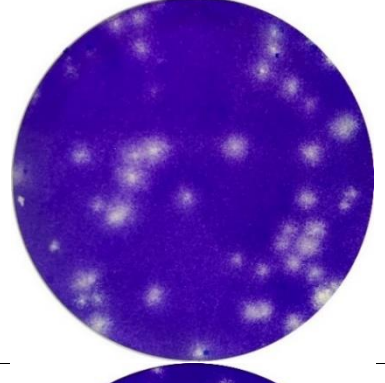
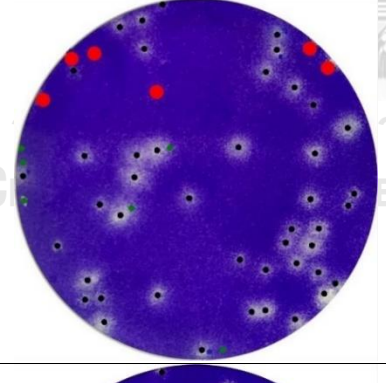
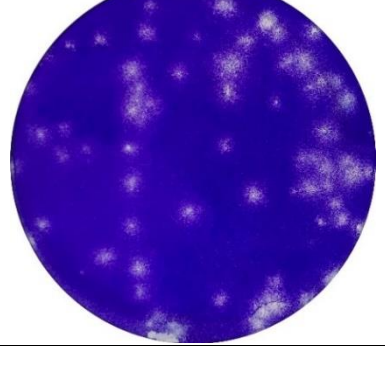
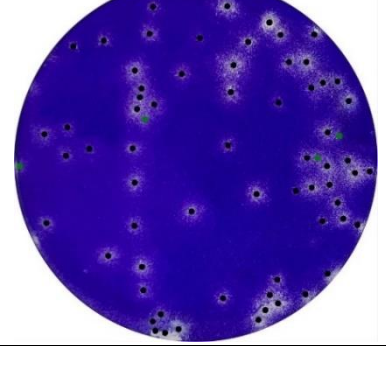
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.1	56	51	6	5	1
		1.3	53	48	6	5	1
		1.2	59	50	1	8	0
		1.2	27	26	4	1	0

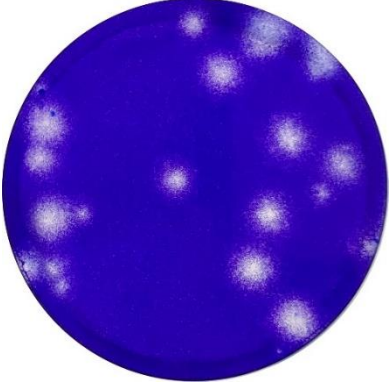
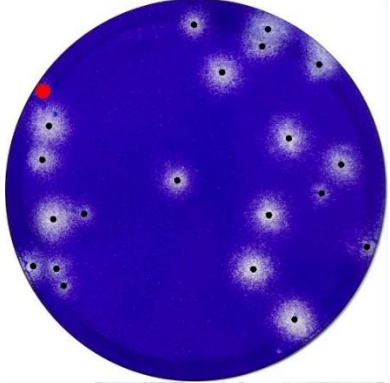


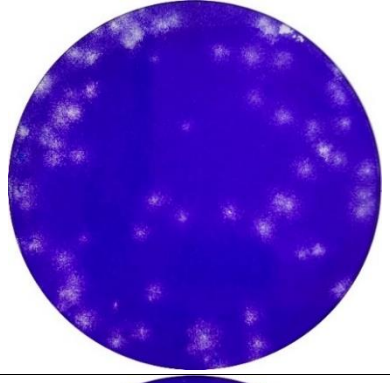
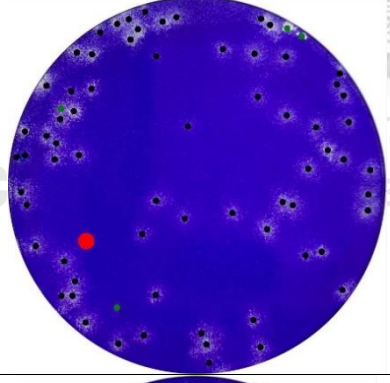

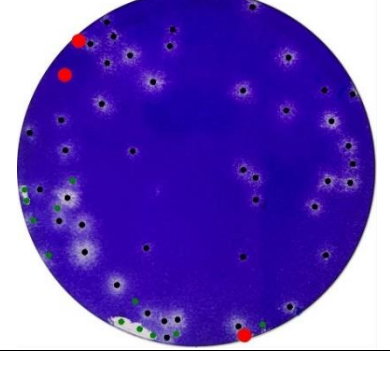
Chikungunya virus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.5	92	81	14	6	2
		1.2	53	50	7	2	0
		1.3	102	95	17	6	1

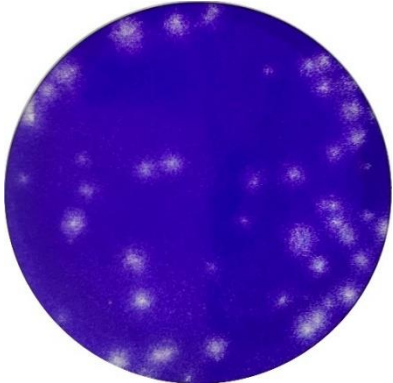
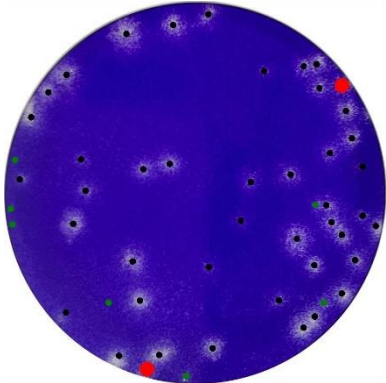
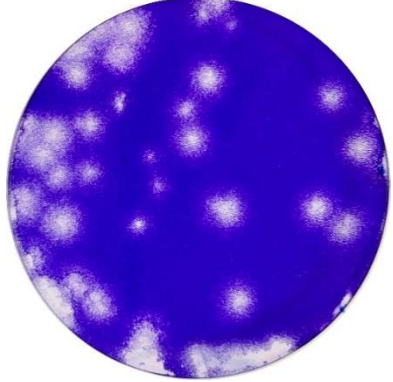
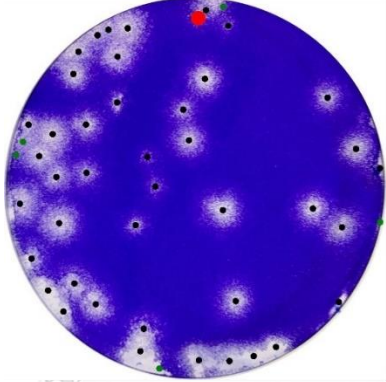
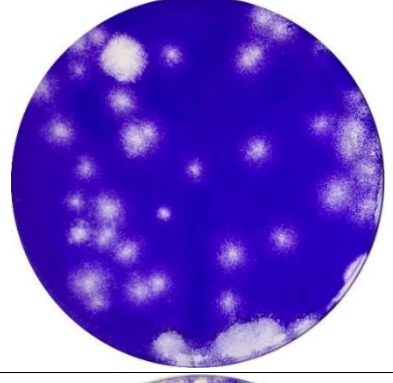
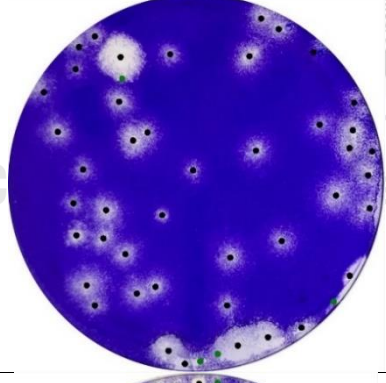
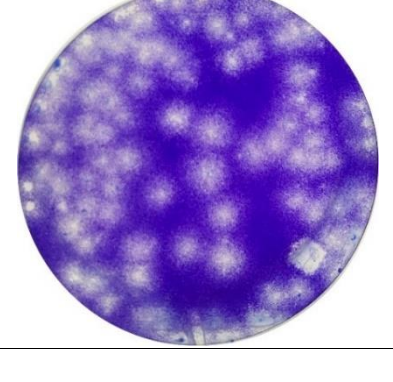
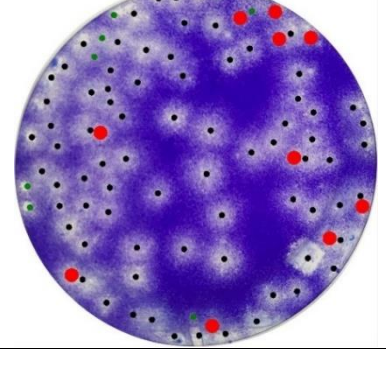
ก.2 PFU ย้อมสี Crystal violet

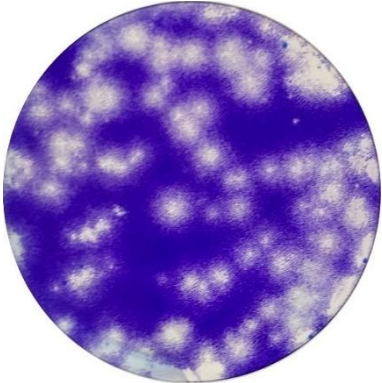
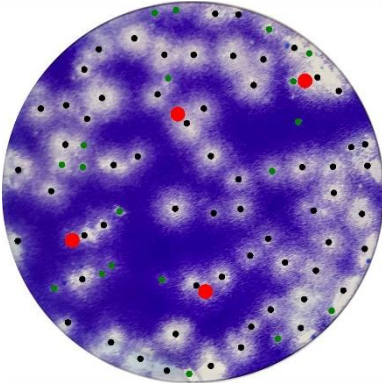
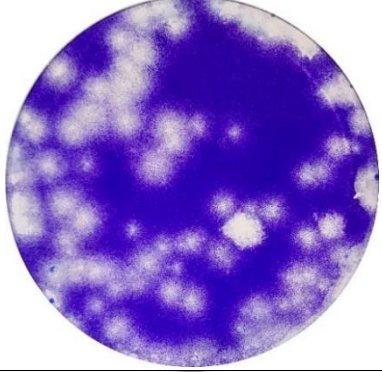
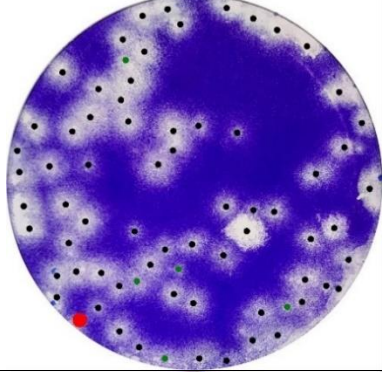
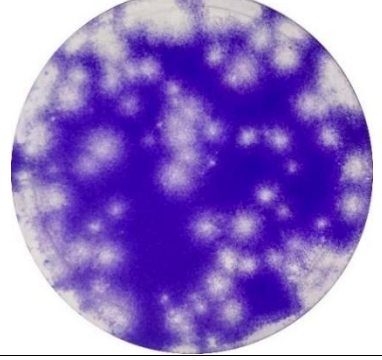
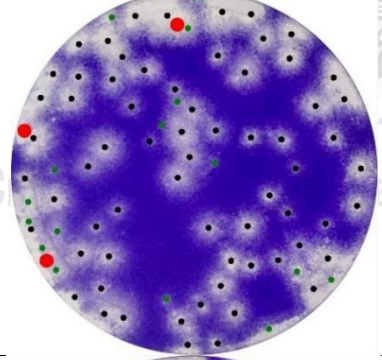
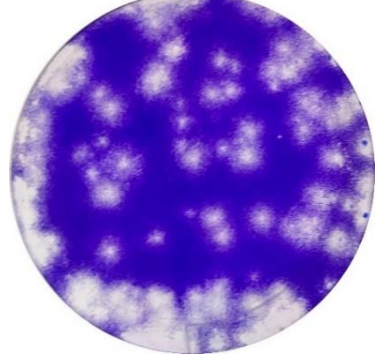
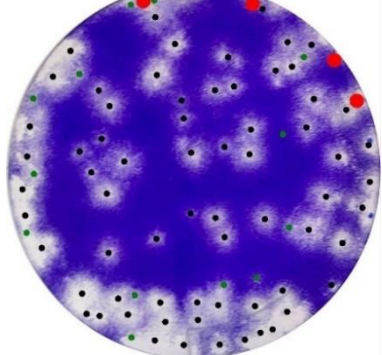
ก.2.2 ไวรัสโคโรนา (Coronavirus)

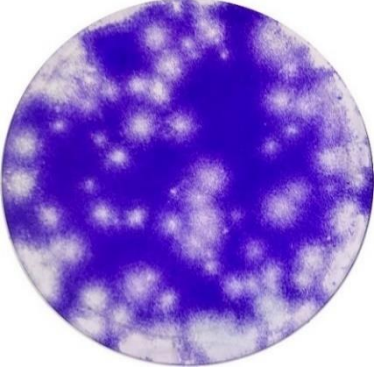
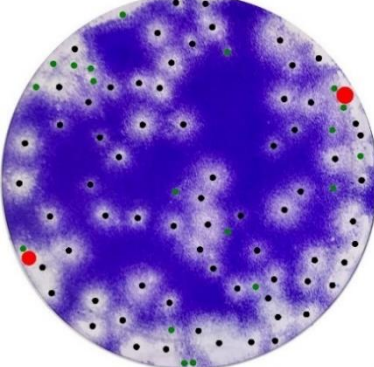
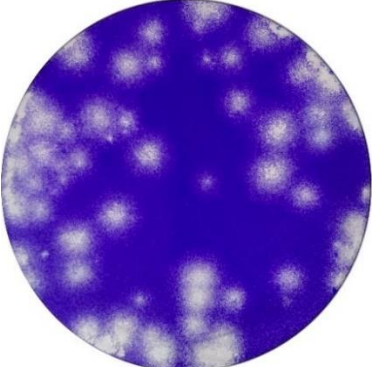
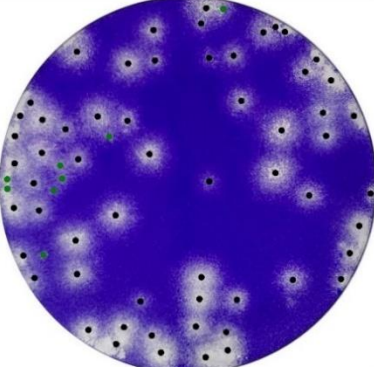
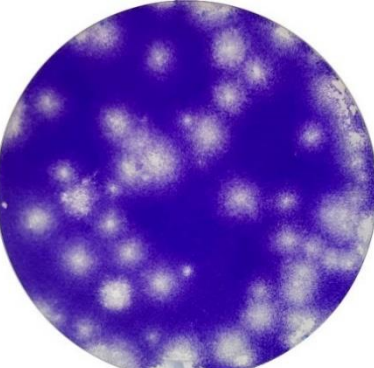
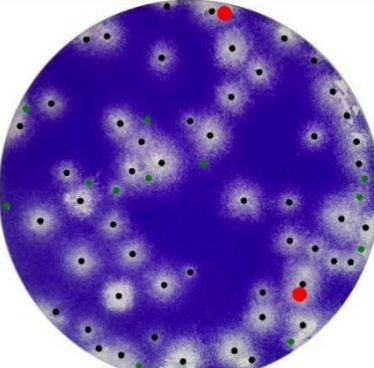
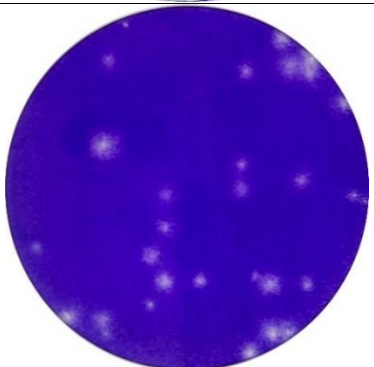
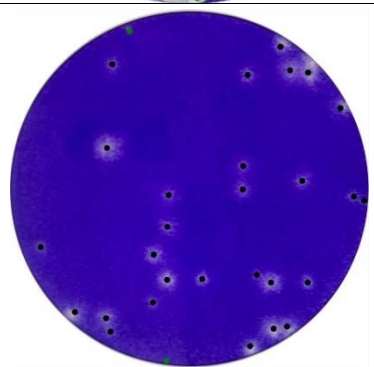
Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.2	49	48	6	0	1
		1.4	46	42	4	3	0
		2.1	54	53	4	1	3

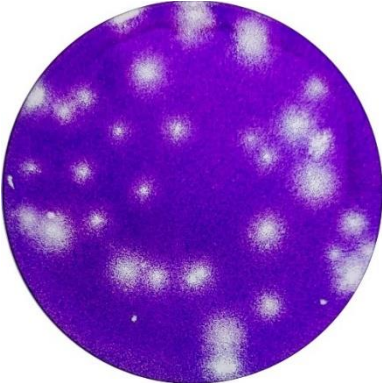
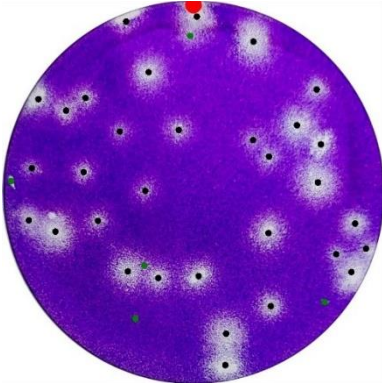
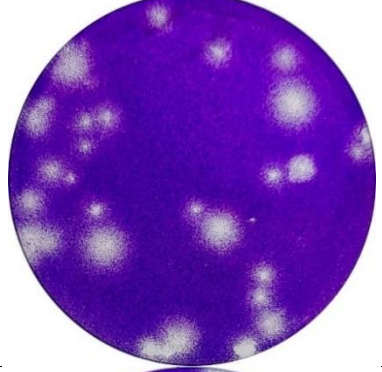
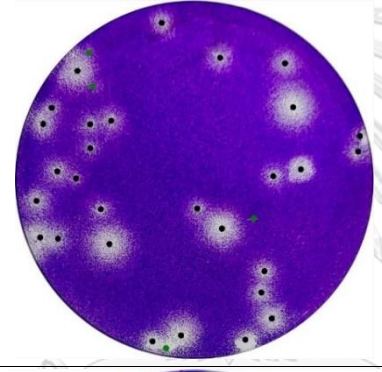
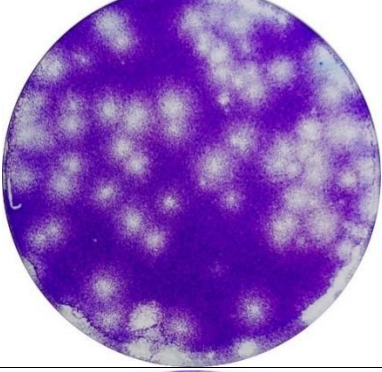
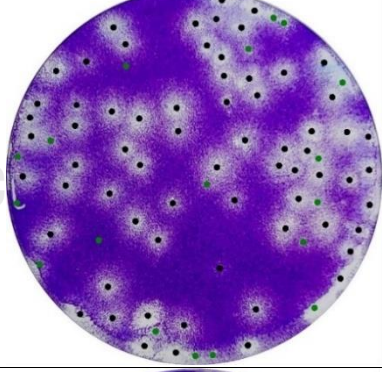
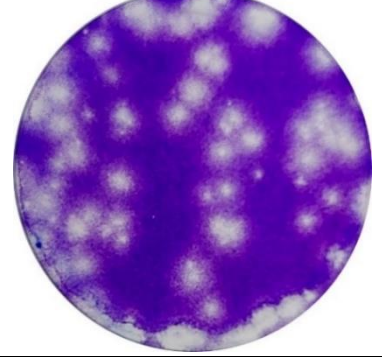
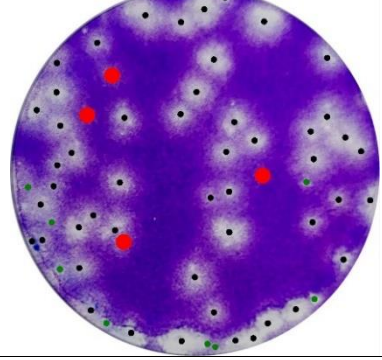
Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2.1	39	39	7	0	3
		2	40	40	3	0	0
		1.8	49	43	6	6	1
		2	60	60	4	0	6

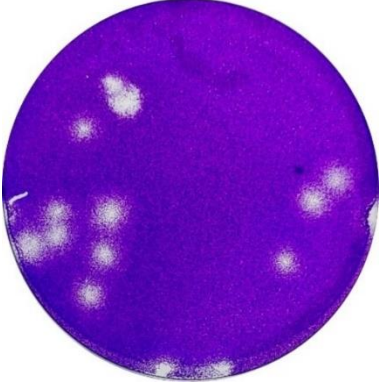

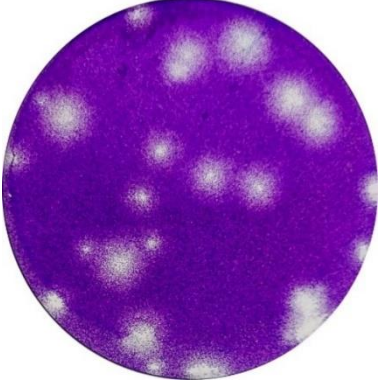
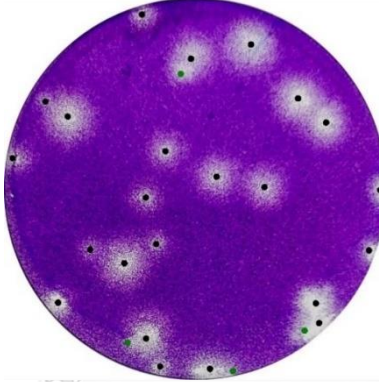
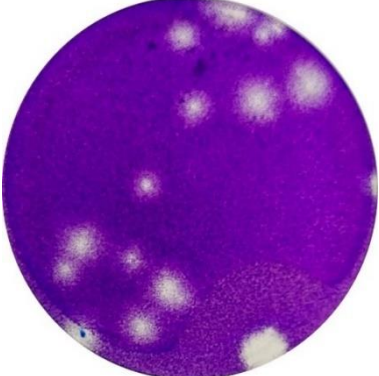
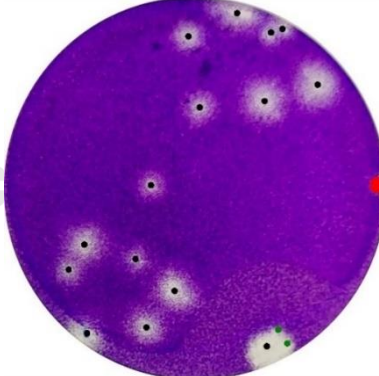
Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.5	20	19	0	1	1
		1.5	13	13	4	0	0
		2	63	62	4	1	6
		2.1	45	42	12	3	1

Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	44	42	7	2	0
		2	42	41	5	1	1
		2.1	44	43	4	0	1
		2.5	87	76	8	10	0

Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2.2	68	62	19	4	0
		1.2	69	66	5	1	1
		2	69	65	17	3	1
		2	73	66	14	4	2

Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		2	69	67	19	2	2
		1.5	55	55	8	0	4
		2	54	52	15	2	0
		2	28	28	2	0	0

Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.5	33	32	5	1	0
		2	29	29	4	0	0
		2	68	66	18	0	1
		1.2	53	48	8	4	2

Coronavirus							
Original image	Proposed method	$\alpha_{optimal}$	Manual count	TP	FP	FN	Over Segment
		1.5	14	14	5	0	0
		1.2	23	23	4	0	0
		1.2	15	14	2	1	1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Nittaya Khamdee
วัน เดือน ปี เกิด	30 March 1997
สถานที่เกิด	Ubonratchathani
วุฒิการศึกษา	Department of Electrical Engineering, Chulalongkorn University
ที่อยู่ปัจจุบัน	17/2 5 Thanwamaharat Road, Nai Mueang Sub-district, Muang Yasothon District, Yasothon, 35000.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY