

การพัฒนาอุปกรณ์ถ่ายภาพอัตโนมัติและระเบียบวิธีการนับจุดสำหรับการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาระบบกายภาพที่เชื่อมประสานด้วยเครือข่ายไซเบอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Automate platform for Capturing and Counting Spot on ELISpot Protocol



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering in Cyber-Physical System

Department of Mechanical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอุปกรณ์ถ่ายภาพอัตโนมัติและระเบียบวิธีการนับจุดสำหรับการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน
โดย	นายชยธร ภูเกียรติกุล
สาขาวิชา	ระบบกายภาพที่เชื่อมประสานด้วยเครือข่ายไซเบอร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.กฤษฎา พนมเชิง

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนัดต์ รัตนสุมาวงศ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.กฤษฎา พนมเชิง)	
.....	กรรมการ
(ดร.ณัฐพล ดำรงค์พลาสีห์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.กิตติกุล โกวีทางกูร)	

ชยธร กู้เกียรติกุล : การพัฒนาอุปกรณ์ถ่ายภาพอัตโนมัติและระเบียบวิธีการนับจุด  
สำหรับการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน. ( Automate platform for Capturing and Counting  
Spot on ELISpot Protocol) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.กฤษฎา พนมเชิง

การวินิจฉัยเป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับแพทย์ในการวิเคราะห์และแนะนำทางเลือก  
ในการรักษาสำหรับผู้ป่วย ELISpot เป็นหนึ่งในกระบวนการวินิจฉัยสำหรับผู้ป่วยที่เป็นที่นิยม ซึ่ง  
ขั้นตอนการปฏิบัติจะเกิดความเบื่อหน่ายและเมื่อยล้า ดังนั้นการพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยจึงเป็นสิ่ง  
สำคัญในการลดภาระงานของแพทย์ ในการพัฒนาระบบแพลตฟอร์มถ่ายภาพจาก 96 Well plate  
และวิเคราะห์ผล ELISpot อัตโนมัติถูกพัฒนาขึ้น ประกอบด้วย IAI TABLE TOP, กล้อง USB  
Microscope และ แผ่นกำเนิดแสง สำหรับโปรแกรมใช้งานแพลตฟอร์มถูกพัฒนาขึ้นจาก C#  
window form application และ ทำการพัฒนาการวิเคราะห์ด้วยรูปภาพจากโปรแกรม Halcon  
จาก MVTec โดยการพัฒนาเน้นให้หน้าต่างซอฟต์แวร์ที่เรียบง่ายและออกแบบมาเพื่อมอบ  
ประสบการณ์ที่เป็นมิตรกับผู้ใช้ ซึ่งผู้ใช้งานจะสามารถใช้งานได้ทั้งในส่วนที่เป็นการถ่ายรูปและ  
วิเคราะห์ภาพ โดนกระบวนการที่ถูกนำมาใช้คือ Dynamic thresholding algorithm  
เปรียบเทียบกับเครื่องที่เป็นที่ยอมรับ CTL immunospot analyzer โดยผลการทดสอบพบว่ามี  
ความถูกต้องอยู่มากกว่า 80 %จากเกณฑ์ที่ถูกกำหนดขึ้น



สาขาวิชา ระบบกายภาพที่เชื่อมประสาน ลายมือชื่อนิสิต .....

ด้วยเครือข่ายไซเบอร์

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 6270372321 : MAJOR CYBER-PHYSICAL SYSTEM

KEYWORD: Optical Inspection, 96-Well plate, ELISpot, Dynamic Threshold

Chayatorn Kukiattikoon : Automate platform for Capturing and Counting Spot on ELISpot Protocol. Advisor: Assoc. Prof. Gridsada Phanomchoeng

Diagnosis is an important process for doctors to analyze and advise treatment options for patients. ELISpot is used as one of the diagnostic processes for the patient. This process is tedious and fatigue. Thus, developing diagnostic tool is important to reduce the workload of doctors. In this work, the automated platform is developed to acquire images from 96-well plate and analyze the number of ELISpot. The platform consists of an IAI Tabletop, a USB microscope camera, and an adjustable light source panel. The control and analysis software are developed by C# language with the industrial standard image processing software MVtec Halcon. To meet the requirements, the simple software interface is also designed for providing a user-friendly experience. Then, the software can control the platform to acquire images and process them for the result. The ELISpot counting is done by the developed dynamic thresholding algorithm. The ELISpot counting algorithm is evaluated with the gold standard. The percentage of the algorithm correction is more than 80%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Cyber-Physical System

Student's Signature .....

Academic Year: 2021

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณความช่วยเหลือและการให้คำปรึกษาของรศ.ดร.กฤษฎา พนมเชิง ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ประจำหลักสูตร CPS ที่คอยให้คำแนะนำข้อมูลและแนวทางการทดสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณนางสาวมาศฟ้า อัมพะวะพะลิน ที่ช่วยดำเนินการด้านเอกสารตลอดหลักสูตร และสุดท้ายขอขอบคุณคุณพ่อและคุณแม่ เพื่อนที่สนับสนุน ให้ข้าพเจ้าได้สานต่อความรู้และสำเร็จการศึกษาอย่างลุล่วง

ชยธร กู้เกียรติกุล



## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	2
บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ.....	4
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	4
1.2 วัตถุประสงค์.....	6
1.3 ขอบเขตการทำงาน.....	6
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ.....	6
1.5 ขั้นตอนงานวิจัย.....	6
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 Counting Algorithm.....	7
2.2 การจัดแสง.....	12
2.3 การออกแบบ UX/UI.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการและการออกแบบ.....	14
3.1 การออกแบบเครื่องนับ ELISpot อัตโนมัติ.....	14
3.1.1 การจัดวาง.....	16

3.1.2 การถ่ายภาพ.....	18
3.1.3 การจัดแสง.....	19
3.1.3.1 parallelism light.....	20
3.1.5 การออกแบบระบบโปรแกรมส่วนติดต่อระหว่างผู้ใช้กับระบบและประสบการณ์ของ ผู้ใช้งาน .....	21
3.1.6 การควบคุม Robot IAI ผ่านโปรแกรม window form application C#.....	21
3.2. การสั่งการในโปรแกรม.....	23
3.2.1 ออกแบบ UX.....	23
3.2.2 ออกแบบ GUI.....	24
3.2.2.1.หน้าต่างสำหรับจัดเก็บข้อมูล (Collecting data page).....	26
3.2.2.2.หน้าต่างสำหรับเพื่อ Model (Calibration page).....	27
3.2.2.3.หน้าต่างสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล (Analyzing page).....	28
3.3 ระเบียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ELISpot(The enzyme-linked immune absorbent spot).....	29
3.3.1 Image shape base matching .....	30
3.3.1.1 Image conversion.....	30
3.3.1.2 Create the model.....	31
<i>Shape Base Matching</i> .....	31
<i>Pattern Matching</i> .....	31
3.3.2 Find the object again .....	34
3.3.3 Alignment image .....	34
3.3.4 Image RGB conversion to HSI image .....	36
3.3.5 Image thresholding.....	36
3.3.6 Dynamic thresholding.....	37



3.3.7 Morphology .....	39
3.3.8 Area filter .....	40
บทที่ 4 วิธีการทดสอบ และผลการทดสอบ .....	42
การทดสอบ Repeatability ของเครื่องจักร .....	42
การทดสอบวัดผลความสามารถของการวิเคราะห์ผลการนับด้วยรูปภาพ.....	43
<i>Pearson's coefficient</i> .....	44
<i>Bland-Altman</i> .....	44
Performance of the platform .....	45
บทที่ 5 สรุปผล.....	46
แนวทางและการพัฒนาต่อ .....	47
บรรณานุกรม.....	78
ประวัติผู้เขียน.....	81



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงแนวคิดการออกแบบ UX ของ Norman มาใช้งานเพื่อหาแนวทางในการออกแบบ .....	24
ตารางที่ 4.2 Error ของการจัดวางชิ้นงานเทียบการยึดด้วยดินน้ำมันและ Stage clip .....	42



## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1.1 เป็นข้อมูลความถี่ของการตีพิมพ์วารสารวิชาการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ELISpot.....	5
รูปที่ 2.1 Histogram ของความเข้มภายใน Wellplate ที่มี ELISpot อยู่.....	10
รูปที่ 2.2 การวาดเส้น Area ในพื้นที่ทับกัน .....	12
รูปที่ 2.3 Templateที่เป็น Overlapping.....	12
รูปที่ 2.4 Template ที่เป็น Aggregating.....	12
รูปที่ 2.5 เปรียบเทียบการเปลี่ยนความเข้มของการจัดแสงแบบ Back light and Front light .....	13
รูปที่ 3.1 แสดงขนาดของ Nunc™MicroWell™ 96-well, Collagen Type I-Treated, Flat-Bottom Microplate .....	15
รูปที่ 3.2 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top .....	15
รูปที่ 3.3 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top .....	17
รูปที่ 3.4 แสดงการจับยึด 96 well plate ด้วย Stage clip .....	18
รูปที่ 3.5 กล้อง Dino-lite digital microscope Premier [17] .....	19
รูปที่ 3.6 ตัวอย่างการจัดแสงแบบ Bright field และ Dark Field [20].....	20
รูปที่ 3.7 LED Light panel สำหรับ Backlighting.....	20
รูปที่ 3.8 แสดงชุดคำสั่งสำหรับสั่งการ IAI Table Top [21] .....	21
รูปที่ 3.9 แสดงระยะที่เกิดการคลาดเคลื่อนไปของวงกลมเมื่อทำการเคลื่อนที่จาก A12 ไป H1 .....	22
รูปที่ 3.10 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top .....	23
รูปที่ 3.11 แสดงตัวอย่างโปรแกรมที่ออกแบบโดยใช้เทคนิคให้การตั้งค่าอยู่ซ้ายมือและผลลัพธ์อยู่ด้านขวามือ.....	25
รูปที่ 3.12 แสดงตัวอย่างโปรแกรมที่ออกแบบโดยใช้เทคนิคให้การตั้งค่าอยู่ซ้ายมือและผลลัพธ์อยู่ด้านขวามือ.....	25
รูปที่ 3.13 แสดงหน้าต่างของ Collecting page.....	26
รูปที่ 3.14 แสดงหน้าต่างของ Calibration page .....	27
รูปที่ 3.15 แสดงหน้าต่าง Analyzing page .....	28

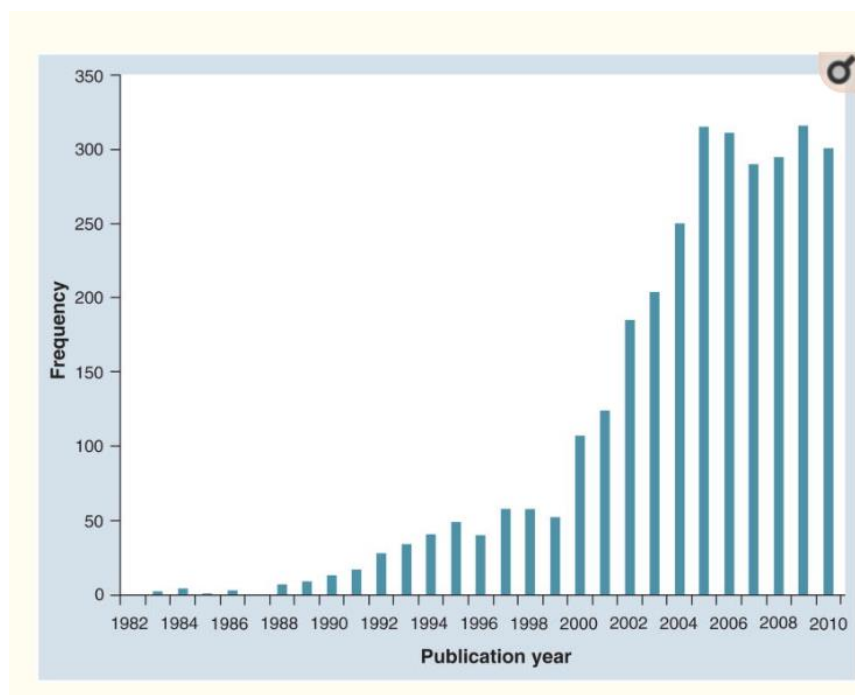
รูปที่ 3.16 แผนภาพระเบียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ELISpot .....	29
รูปที่ 3.17 Well plate ก่อนแปลงภาพจาก color image เป็น Gray Scale Image .....	30
รูปที่ 3.18 เปรียบเทียบการแปลงค่า Pyramid Image ที่ 1 ไป 4 .....	32
รูปที่ 3.19 เปรียบเทียบการสร้าง model จากค่า Contrast ที่มากและน้อย .....	32
รูปที่ 3.20 การกำหนด Region เพื่อระบุพื้นที่ที่สนใจเป็นรูปแหวน .....	33
รูปที่ 3.21 Feature ที่ถูกนำมาใช้ในการทำ model .....	33
รูปที่ 3.22 XLD จากการ Create Model จาก Well Plate .....	34
รูปที่ 3.23 แสดงการทดสอบนำ Model ที่ได้จากการสร้างมาทดสอบกับรูปขึ้นต่างๆ .....	34
รูปที่ 3.24 Well plate ก่อนทำการ Alignment Image .....	36
รูปที่ 3.25 Well plate หลังทำการ Alignment Image .....	36
รูปที่ 3.26 (a) รูปต้นแบบ .....	37
รูปที่ 3.27 (c) แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ Dynamic Thresholding .....	38
รูปที่ 3.28 (a) รูปต้นแบบของ Well Plate .....	38
รูปที่ 3.32 แสดงการแปลงภาพด้วย Dilation [24] .....	40
รูปที่ 3.33 แสดงการจัดการข้อมูลจำพวก noise และ ฝุ่นออกด้วยกระบวนการ Morphology .....	40
รูปที่ 3.34 ตัวอย่างก่อนและหลังทำการจัดการข้อมูลด้วย Area filter .....	41
รูปที่ 4.1 Boxplot in range 0 to 90 spots .....	43
รูปที่ 4.2 Boxplot in range 0 to 14 spots .....	44
รูปที่ 4.3 Bland Altman plot of developed platform .....	45

## บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันการวินิจฉัยและการวิจัยทางการแพทย์เป็นปัจจัยที่สำคัญในด้านการดูแลสุขภาพ การรักษาโรค และรวมถึงการพัฒนายารักษาโรค หนึ่งในเครื่องมือที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยคือ Enzyme-linked immunosorbent spot หรือ ELISpot ซึ่งเป็นกระบวนการในการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันของ ร่างกาย (Antibody) โดยเฉพาะที่นิยมคือใช้ตรวจสอบ CD4+ T-cell และ CD8+ T-cell ซึ่งมีหน้าที่ ตรวจจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย โดยหลักการทำงานของ ELISpot นั้นทำงานได้ โดย เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้รับแอนติเจนหรืออยู่ในสภาวะอักเสบ ระบบภูมิคุ้มกันการ ตอบสนองจะคัดหลั่งสารไซโตไคน์[1]ซึ่งจะมีลักษณะเป็นจุดสี โดยจะถูกนำมานับและวิเคราะห์ เพื่อใช้ในการประเมินภูมิคุ้มกัน

ด้วยจุดเด่นที่สามารถให้ผลลัพธ์ในเชิงปริมาณได้ จึงง่ายต่อการเปรียบเทียบผลการทดสอบ โดย ELISpot เป็นกระบวนการที่ถูกนำมาใช้ในงานวิชาการตั้งแต่ปี 1982 A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISpot), assay for enumeration of specific antibody-secreting cells [2]. Immunol Methods. 1983;65(1-2):109-121. Original paper describing enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) และมีแนวโน้มที่มากขึ้น อ้างอิงตามรูปที่ 1.1 เป็นข้อมูลความถี่ของการตีพิมพ์วารสารวิชาการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ELISpot จะสังเกตว่าการ ตีพิมพ์มีความถี่ที่มากขึ้นอย่างมีนัยยะโดยเริ่มจากปี1982 จบถึงปี 2010 [3]



รูปที่ 1.1 เป็นข้อมูลความถี่ของการตีพิมพ์วารสารวิชาการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ELISpot

ในการใช้แบบดั้งเดิมนั้น การเก็บข้อมูล ELISpot นั้นจะเป็นการใช้นักวิจัยผู้เชี่ยวชาญด้าน ELISpot นับเม็ดสีภายในหลุมทดสอบ ซึ่งต้องใช้เวลาในการนับที่มากและยังเป็นการสิ้นเปลืองทรัพยากรบุคลากรแทนที่จะไปทำงานต่างๆ เพื่อลดภาระของผู้วิจัย จึงเกิดการพัฒนาระบบวิเคราะห์ด้วยภาพเพื่อมาลดภาระที่เกิดขึ้น เช่น (Guozhen, 2018) Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on image captured at near-infrared light [4]; (Dipti, 1995) Bacterial colony counting using distance transform [5]; (Pannawin, 2019) Development of Automated Platform for Image Capturing and counting Algorithm for Viral Plaque [6] เป็นต้น

ถึงแม้ว่าระบบการวิเคราะห์ภาพในการทำ ELISpot นั้นมีการพัฒนาแต่พบว่าราคาของเครื่องนั้นยังมีราคาที่สูง และในบางงานพัฒนาไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งานในเชิงปฏิบัติ เนื่องด้วยการใช้งาน Software ที่ซับซ้อนไม่เหมาะสมกับผู้ใช้งาน และในบางงานวิจัยไม่รองรับการใช้งานด้วยไมโครเวลเพลท (well plate) จึงเกิดวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขึ้น

โดยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมุ่งเน้นในการนำเสนอการสร้างเครื่องเก็บผลและวิเคราะห์ สำหรับ ELISpot ด้วยระบบอัตโนมัติ เพื่อลดภาระ, ความผิดพลาดของบุคคล, ลดต้นทุน โดยการพัฒนา

โปรแกรมควบคุมหุ่นยนต์เคลื่อนที่สามแกนที่ได้ทำการติด กล้อง microscope บน end effector ในการเคลื่อนไปถ่ายรูปรูปบนไมโครเวลเพลทแต่ละหลุมแล้วนำภาพมาทำการวิเคราะห์ด้วย computer vision เพื่อหาจำนวน spot

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. พัฒนาโปรแกรมสำหรับควบคุมสั่งการระบบอัตโนมัติสำหรับเก็บข้อมูล 96 well plate assay
2. พัฒนาการนับจุดสำหรับวิเคราะห์ ELISpot

## 1.3 ขอบเขตการทำงาน

1. สร้างโปรแกรมที่สามารถควบคุมผ่านคอมพิวเตอร์เพื่อสั่งการ IAI Table top ได้
2. โปรแกรมพัฒนา(UX/UI)สำหรับผู้ใช้งานในกลุ่ม นักวิจัย
3. สามารถเก็บข้อมูลบนโดยการถ่ายภาพหลุมแต่ละหลุมใน well assay ชนิด 96 หลุม
4. สามารถนับ spot เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ELISpot

## 1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอขั้นตอนการสร้างเครื่องนับ

## 1.5 ขั้นตอนงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการสั่งการ IAI Robot เพื่อนำไปใช้ในการส่งเคลื่อนที่
2. ศึกษาและออกแบบอุปกรณ์ในการจ่ายแสงให้ชิ้นงาน
3. ศึกษาการสร้าง GUI จาก C# เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถทำงานได้ผ่านคอมพิวเตอร์
4. ศึกษาและรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
5. ศึกษาและปรับปรุงการวิเคราะห์ด้วยภาพ
6. ทำการทดลองและเก็บผล
7. เก็บผลตอบรับและนำข้อมูลมาแก้ไข
8. สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ
9. ทำรายงานและรูปเล่มวิทยานิพนธ์

## บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 Counting Algorithm

งานวิจัยต่างๆที่ผ่านมาได้มีการทำระบบวิชั่นเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ผลลัพธ์ที่ได้จากการทดสอบภายในห้องแลป จากงานวิจัยของ Guozhen Zhu และคณะได้นำเสนอ “automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light [4]” โดยได้ทำเสนอการเก็บข้อมูลภาพโดยให้เกณฑ์กำหนดนั้นคือ ภาพที่ได้ควรมี Contrast ของ Background ที่สม่ำเสมอ ดังนั้นการจัดการถ่ายรูป ให้แหล่งกำเนิดแสงเพื่อความคมชัดของงาน และ เพื่อป้องกันการที่แสงภายนอกจะมีผลต่อการรับภาพ ระบบควรมีกล่องเพื่อป้องกันแสงจากภายนอก ส่วนในการวิเคราะห์ด้วยแมชชีนวิชั่นนั้น งานวิจัยนำเสนอการนับ Colonies ออกเป็นขั้นตอนหลักๆเป็น 4 ขั้นตอน (1) ทำการ Image Thresholding เพื่อทำการแยก colony ที่ต้องการออกจาก Background และ (2) ทำกระบวนการ Label processing เพื่อระบุ region ของ colony (3) กำหนดเกณฑ์ของขนาดที่เล็กที่สุดของ หนึ่ง Colony เพื่อพิจารณา area ของ Colony ที่ต้องการ (4) สำหรับโคโลนีที่ขนาดใหญ่จะถูกรับการประมวลผลอีกที (Morphological Image Processing) โดยการนำไปเข้า Hole-filling method ก่อนที่จะตามด้วยกระบวนการ Distance transform [7] และ Watershed เพื่อแยก Colony ที่มีการเชื่อมติดกันให้แยกออกจากกัน จากการศึกษาข้างต้น การใช้ Image Thresholding สามารถพิจารณาพื้นที่ที่เป็น Colony แยกจาก background ได้ แต่เป็นเงื่อนไขที่ Background มีความสะอาดหรือก็คือมีค่า contrast ที่ต่างจาก Colony อย่างมีนัยยะ

งานวิจัยของ Siwaporn.B ในหัวข้อ”Simplified dengue virus microwell plaque assay using an automated quantification program” [8] ได้นำเสนอขั้นตอนการนับ Plaque บน 96 well plate โดยการใช้เครื่อง Scanner มาใช้ในการถ่ายรูป 96 well plate แล้วหลังจากนั้นจึงทำการแปลง Grey image ก่อนที่จะมาการตีรูปแต่ละ Well มาทำการ Gaussian filter แล้วนำรูปไปทำ Global หลายๆช่วงมารวม

งานวิจัยของมหาลัย Suzhou Vocation ได้นำเสนอการนับ Colony โดยใช้ Distance Transform and progressive Erosion ในหัวข้อ” Automated Count and Identification of Cell Colonies Based on Distance Transform and Progressive Erosion” [9] โดยมีขั้นตอนคือ (1) ทำการแปลงรูป เป็น Gray scale (2) ทำการ Adaptive threshold โดยคำนวณได้จากสมการที่ 2.1



$$u^* = \min \sum_{x>u} (x-c_1)^2 + \sum_{x\leq u} (x-c_2)^2$$

$$c_1 = \frac{\sum_{x>u} x}{\text{card}(\{x | x > u\})}, c_2 = \frac{\sum_{x\leq u} x}{\text{card}(\{x | x \leq u\})}$$

สมการที่ 2.1 หาค่า Adaptive threshold

โดย  $C_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของความเข้มของ pixel ที่มีค่ามากกว่า  $u$

$C_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของความเข้มของ pixel ที่มีค่าน้อยกว่า  $u$

$X$  คือ ค่าความเข้มของ pixel นั้นๆ

$u^*$  คือ ค่า optimal threshold ที่หาได้

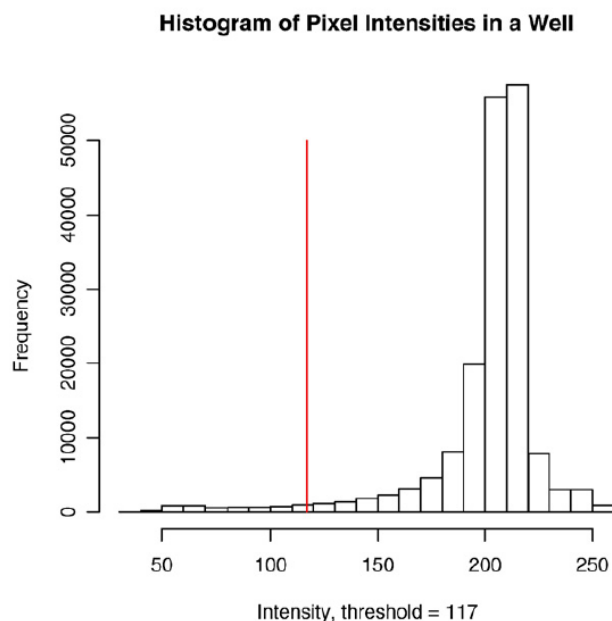
$u$  คือ ค่า threshold ที่กำหนด

เมื่อทำการผ่าน Threshold เสร็จจะได้ Binary image มา (3) นำภาพที่ได้ทำ 4-way connected components เพื่อระบุ Pixel ที่เป็นขอบของ Well plate หลังจากนั้นนำภาพที่มีข้อมูลลบด้วยภาพของขอบ well plate เพื่อให้เหลือแต่ colony ที่ต้องการนับ (4) เพื่อแยก colony ที่อยู่ติดกัน การทำ distance transform เพื่อให้ค่า Gray value ของจุดกึ่งกลางของ colony มีค่าที่สูงขึ้นมา เมื่อทำการเทียบกับค่ารอบข้าง (5) ทำ Progressive Erosion เพื่อแยก colony ออกจากกันเพื่อให้สามารถนับ colony ได้ ข้อดีของการ Adaptive Threshold (Dynamic Thresholding) ในการแยก Colony ออกจาก Background จะสามารถเพิ่มความสามารถในการแยกวัตถุออกจาก Background เนื่องจากค่า Thresholding นั้นจะได้จากค่าเฉลี่ยของความเข้มของ Pixel ของการถ่ายภาพแต่ละครั้ง ทำให้กรณีที่ Colony มีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่เด่นชัดจากฉากหลัง ก็สามารถดึงข้อมูลเพื่อมาวิเคราะห์ต่อได้

งานวิจัยของ Silvio D.Brugger และคณะได้ทำการศึกษาเรื่อง “Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates” [10] ได้นำเสนอแนวคิดเรื่องการจัดวางแสง โดยพบว่าการจัดวางตัวกำเนิดแสงอยู่ระหว่างกล้อง กับวัตถุจะทำให้เกิดการสะท้อนของแสง ทำให้ภาพที่ได้เกิดความไม่เป็นระเบียบขึ้น จึงได้เสนอให้ทำการจัดวางต้นกำเนิดแสงให้อยู่ข้างๆวัตถุ หรือ

อยู่ด้านหลังวัตถุแทน และได้นำเสนอการนับ Colony ที่มีลักษณะต่างกัน โดยได้จัดเรียงลำดับขั้นตอน ดังนี้ (1) ใช้ TOP-Hat filter เพื่อลดความไม่สม่ำเสมอของฉากหลัง (2) ปรับภาพให้เป็น Binary โดยใช้เกณฑ์จาก Otsu method (3) ใช้ Pattern Recognition literature ในการหารูปร่างวงกลมที่ Tolerance เพื่อกำหนดส่วนไม่มีวงกลมให้กลายเป็นสีดำไป (4) ทำการใช้ Adaptive thresholding โดยปรับตาม neighboring pixel เพื่อให้ได้รูปภาพที่มีความต่อเนื่อง และกำจัดสัญญาณรบกวนโดยการเอาภาพสีเขียวมาลบ (5) ลบพื้นที่ที่ติดกับขอบ (6) ทำการแยกกลุ่ม Colony ที่อยู่ติดกันโดยใช้ Distance transformation และ ทำการแบ่งแต่ละส่วด้วยกระบวนการ Watershed (7) ทำการคัดกรองอีกรอบเพื่อเลือกแสดงผลเฉพาะกลุ่มที่มีขนาดอยู่ในช่วงที่กำหนด และนำผลที่ได้ไปทำการนับด้วย Bayes Classifier

งานวิจัยของ Natalie และคณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ในหัวข้อ “The automated counting of spots for the ELISpot assay [11]” ได้นำเสนอกระบวนการนับ ELISpot assay ด้วยการแยกข้อมูลของ Spot ออกจาก Background ด้วยการบวนการ Intensity Thresholding ดังรูปที่ 2.1 ได้แสดง Histogram ของความเข้มภายใน Wellplate ที่มี ELISpot อยู่ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้ได้ถูกนำไปเปรียบกับการนับโดยผู้เชี่ยวชาญพบว่า ตัวอย่างที่โปรแกรมนับถูกต้องจะเป็นตัวอย่างที่มีจุดตรงกลางที่เข้ม และมีการไล่ของขอบที่ชัดเจน แต่จะนับผิดนตัวอย่างที่มี 1.ขนาดที่เล็กเกิน 2.อยู่ที่ขอบของ Well plate 3.มีการเรียงตัวกันเป็นลักษณะเส้นผมหรือรอยแตกของ Well plate 4. มีลักษณะเป็นเศษขยะ ไร้รูปร่าง (มักจะมึลักษณะเป็นสีเข้มมากๆหรือไม่เป็นวงกลม)



รูปที่ 2.1 Histogram ของความเข้มภายใน Wellplate ที่มี ELISpot อยู่ งานวิจัยของ Nasuriati J. และคณะ ได้ตีพิมพ์ในหัวข้อ “Noise Removal and Enhancement of Binary Image Using Morphological Operations [12]” โดยได้นำเสนอ การจัดการลักษณะทางสีฐานวิทยาของรูปภาพขั้นพื้นฐานเพื่อใช้ในการลด noise และแปลงภาพ binary โดยมีการ ขั้นตอนดังต่อไปนี้

- Dilation ใช้เพื่อขยายขอบเขตของวัตถุและปิดช่องว่างในวัตถุ
- Erosion ใช้เพื่อลดขอบเขตของวัตถุ
- Opening คือการ Erosion แล้วทำการ Dilation ต่อ
- Closing คือการทำ Dilation แล้วทำการ Erosion ต่อ
- Filling คือการเปลี่ยนค่าของพิกเซลที่แตกแยก (isolated pixel) กับรอบข้าง (Neighborhood) ให้มีค่าเป็น 1 จาก 0
- Majority คือการเปลี่ยนค่าพิกเซลตามค่าของพิกเซลรอบข้าง (Neighborhood)

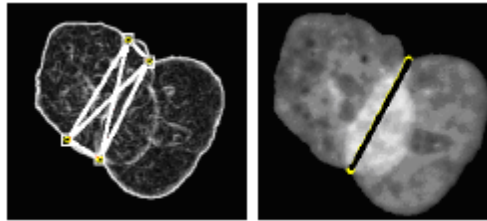
งานวิจัยของ Pannawich และคณะ ได้ทำงานวิจัยในหัวข้อ “Development of Automated Platform for Image Capturing and Counting Algorithm for Viral Plaque” [6] ได้ทำการพัฒนาเครื่องนับ Plaque อัตโนมัติ โดยได้นำเสนอการวิเคราะห์ภาพที่พัฒนาบน Halcon คือ (1) ทำการตัดขอบวงกลมโดยการใช้ Shape-Based Matching ที่พัฒนาบน Halcon (2) นำภาพที่ได้มา

แปลงจาก RGB Image เป็น Gray scale image (3) ทำ mean filter เพื่อทำการลด noise (4) ทำ thresholding เพื่อเลือกพื้นที่ที่สนใจ (5) ทำ Watershed segmentation เพื่อแยก Plaque ที่เกิดการซ้อนทับกัน (6) ทำการนับแยกแต่ละ segment ที่ได้

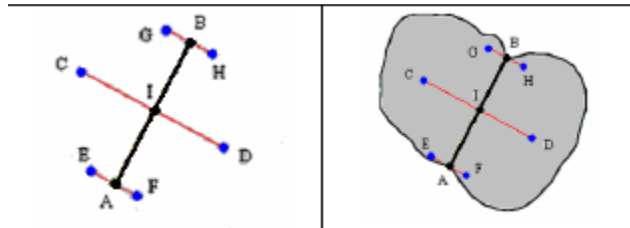
งานตีพิมพ์ของ Beucher S. และคณะได้ตีพิมพ์ในหัวข้อ “Use of watershed in contour detection” [13] ได้ให้ข้อเสนอในการใช้ watershed ในการทำ contour detection โดยได้กล่าวว่าการทำ Contour Detection ที่เป็นที่ยอมรับคือ (1) การทำ Contour Detection โดยใช้ Gradient ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้นั้นบางครั้ง จะไม่เป็นวัตถุที่เป็นรูปปิด (Well closed) หรือไม่ก็อาจจะมีเส้นขอบที่บางเกินไป (2) Gray levels histograms หรือที่เป็นที่ยอมรับเรียกกันว่า Thresholds ซึ่งจะต้องการ Gray histogram ที่มีความเรียบ ทำให้ไม่สามารถทำงานได้กับรูปภาพที่มีช่วงค่าสลับหลายค่า ผู้เขียนจึงเสนอวิธีการใช้ watershed ในการทำ contour โดยให้ผลที่เป็น Well closed โดยมีข้อดีคือไม่ต้องมากำหนดค่า threshold ของข้อมูลที่จะทำการ segmentation

งานวิจัยของ D.P. Mukherjee และ คณะ ได้ทำการวิจัยในหัวข้อ “Bacterial colony counting using distance transform” [5] ได้นำเสนอการนำ Distance transform มาทำ labeling เพื่อนับ Colony โดยมีขั้นตอนคือ (1) ทำการ Thresholding รูปภาพที่พิจารณา โดยจะได้ผลลัพธ์เป็น Grid โดย 1 เป็นตัวแทนของ colony และ 0 เป็นตัวแทนของ background (2) ทำกระบวนการ Distance transform (3) Thresholding distance transform space โดยกำหนดค่ามากที่สุดเป็น  $3 \times 3$  (local maxima is calculated in  $3 \times 3$  neighborhood) (4) ทำการ thresholding gray level โดยค่าขึ้นอยู่กับผู้ทำการทดสอบ (5) ทำการ labeling region ที่ติดกันโดยมีการทำ region growing ที่ 8 connected neighborhood

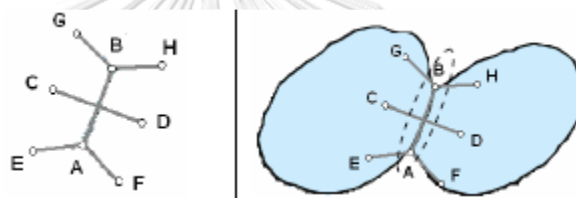
งานวิจัยของ F.Cloppet และ คณะได้ทำการศึกษาเรื่อง “Segmentation of overlapping/aggregating nuclei cells in biological image” [14] โดยได้นำเสนอการแยก nuclei ที่ aggregating/overlapping nuclei โดย (1) ทำการพิจารณาขอบ(contour)ที่มีค่าความโค้งสูงให้มีโอกาสเป็น aggregating/overlapping (2) ทำการวาดเส้น Area ในพื้นที่ทับกันดังรูปที่ 2.2 ทำการเปรียบเทียบกับ Template ที่ได้จากสังเกตจากข้อมูลจำนวนมากดังรูปที่ 2.3 เป็นการเปรียบเทียบ Template ที่เป็น Overlapping และ ในรูปที่ 2.4 เป็นการเปรียบเทียบกับ Template ที่เป็น Aggregating ในกรณีที่มีการทับกันหลาย nuclei สามารถนำ Watershed มาช่วยในการแบ่งพื้นที่ของแต่ละ nuclei ได้



รูปที่ 2.2 การวัดเส้น Area ในพื้นที่ที่ทับกัน



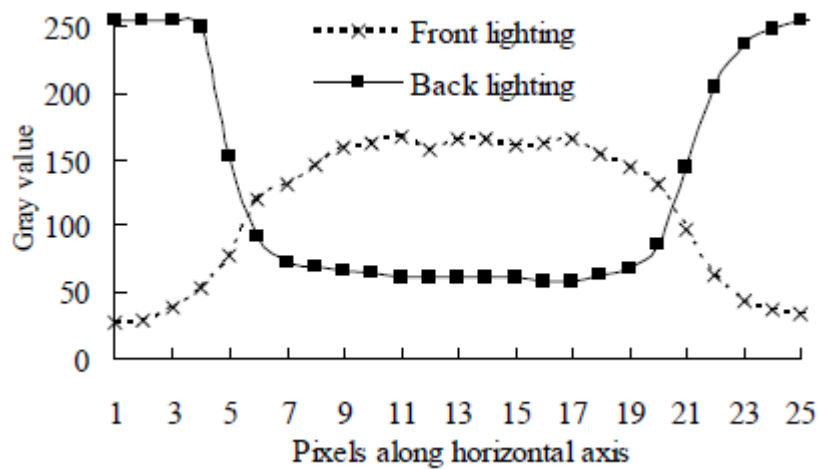
รูปที่ 2.3 Template ที่เป็น Overlapping



รูปที่ 2.4 Template ที่เป็น Aggregating

## 2.2 การจัดแสง

งานวิจัยของ Muhammad Ali ASHRAF ในหัวข้อ “Use of Machine Vision to Sort Tomato Seedling for Grafting Robot” [15] ได้มีการทดสอบตรวจขนาดของกิ่งไม้เพื่อใช้ Robot มาคัดแยก โดยในการทดสอบมีการเปรียบเทียบตำแหน่งการจ่าย Light Source จาก Front Lighting และ Back Lighting โดยวางที่ระยะห่างที่ Field of view นั้นมาสามารถมองได้ครบถ้วนพอดี ซึ่งได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 2.5 จะพบว่า การวาง Light Source ที่เป็น Back light สามารถกำหนดค่าขอบของ Threshold ได้ดีกว่าการวางแสงแบบ Front lighting



รูปที่ 2.5 เปรียบเทียบการเปลี่ยนความเข้มของการจัดแสงแบบ Back light and Front light

### 2.3 การออกแบบ UX/UI

งานตีพิมพ์ของนาย John P.Wilson ได้ทำการออกแบบ User interface และ User experience [16] สำหรับใช้ในการให้ข้อมูลด้านสารสนเทศภูมิศาสตร์ โดยได้ให้หลักการในการออกแบบแผนที่แบบโต้ตอบ ดังขั้นตอนต่อไปนี้ 1. Forming the Goal 2. Forming the Intention 3. Specifying an Action 4. Executing the Action 5. Perceiving the system state 6. Interpreting the system state 7. Evaluating the Outcome

จากวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องดังกล่าวข้างต้น พบว่ากระบวนการในการวิเคราะห์ภาพนั้น จำเป็นต้องมีกรรมวิธีต่างๆ โดยเริ่มจากการจัดตั้งแสง การเก็บข้อมูล การแยกข้อมูลส่วนที่ต้องการใช้ในการวิเคราะห์ ก่อนที่จะมาเข้ากระบวนการแยกจุดเพื่อนับข้อมูล โดยเงื่อนไขที่ต่างกับงานวิจัยข้างต้นคือ งานวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาเพื่อนำมาใช้งานร่วมกับ 96 well plate ซึ่งต่างจากงานวิจัยข้างต้น ซึ่งเป็นการเก็บข้อมูลบน Petri dish (งานเพาะเชื้อ) นอกจากนี้ด้วย Resolution ที่ต่ำกว่าซึ่งอยู่ที่ 1.3 Megapixel (1280\*1024) ชนิด JPG ซึ่งต่างจากงานวิจัยข้างต้นที่เป็นกล้อง 3.3 Megapixel (2048\*1536) ทำให้งานวิจัยนี้มีข้อแตกต่างในการพัฒนาขึ้น

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการและการออกแบบ

เนื่องจากวิทยานิพนธ์นี้เป็นการพัฒนาเครื่องนับอัตโนมัติขึ้น รวมถึงใช้งานควบคู่กับโปรแกรมที่ถูกพัฒนาขึ้น ผู้จัดทำจึงได้แบ่งการจัดทำออกเป็น 3 ส่วน คือการออกแบบเครื่อง, การออกแบบระบบโปรแกรมส่วนติดต่อระหว่างผู้ใช้กับระบบหรือประสบการณ์ของผู้ใช้งาน และ การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยแมชชีนวิชั่น

#### 3.1 การออกแบบเครื่องนับ ELISpot อัตโนมัติ

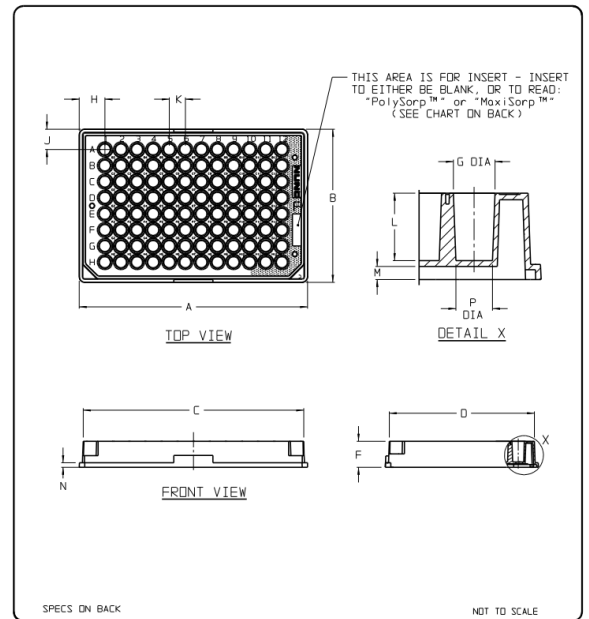
ในการออกแบบเครื่องนับ ELISpot นั้นถูกออกแบบเพื่อให้ใช้งานที่เหมาะสมกับ Standard 96 Well plate ซึ่งเป็นถาดเพาะเลี้ยงที่เป็นที่นิยมในการทดสอบซึ่งมีขนาดกว้าง ยาว สูงอยู่ที่ 127.76 mm x 85.47mm x 11.40 mm โดย well plate assay ที่เลือกใช้ศึกษาเป็น Serie “Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Collagen Type I-Treated, Flat-Bottom Microplate” ซึ่งมีขนาดแสดงดังรูปที่ 3.1 และเพื่อให้เหมาะสมกับการถูกนำไปใช้งานในแลปและง่ายต่อการเคลื่อนย้าย ในวิทยานิพนธ์นี้ได้เลือกการพัฒนาเครื่องนับอัตโนมัติโดยการดัดแปลงหุ่นยนต์ที่มีขนาดเล็ก IAi ROBOT รุ่น TABLE TOP TT ซึ่งเป็นหุ่นยนต์เคลื่อนที่สามแกน มีระยะช่วงการทำงาน X = 200 mm, Y= 200 mm, Z = 100 mm ดังรูปที่ 3.2 โดยมี resolution ที่ 0.001 mm ทั้ง 3 แกนการเคลื่อนที่



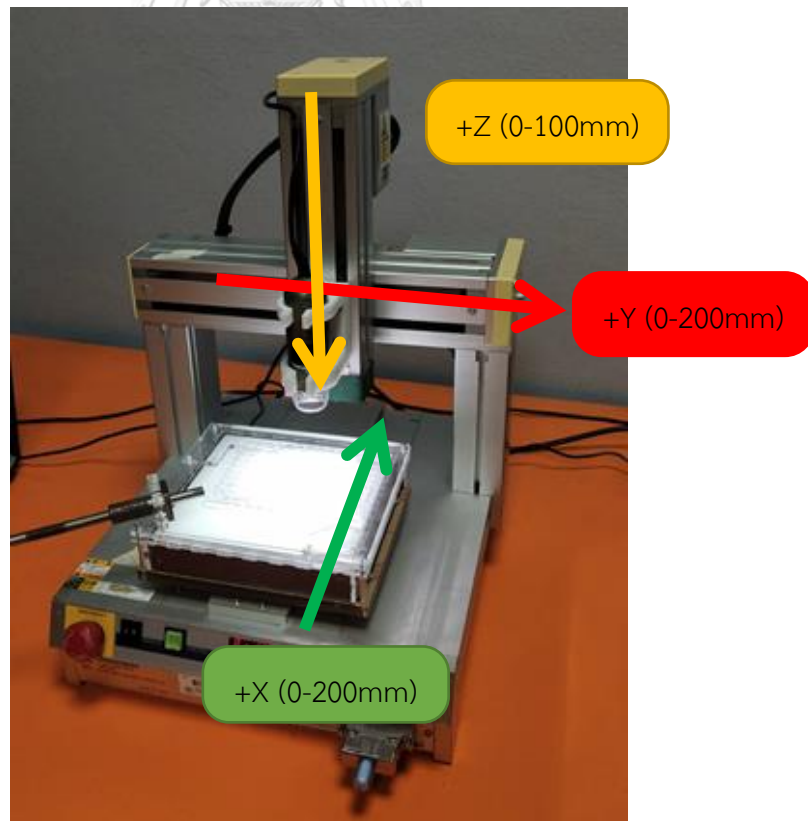
CATALOG NUMBER	SEE BELOW	
NOM. CAP. (ul)	400	
MATERIAL	PS	
	INCH	MM
A (BASE LENGTH)	5.030	127.76
B (BASE WIDTH)	3.365	85.47
C (TOP LENGTH)	4.85	123.3
D (TOP WIDTH)	3.20	81.2
F (OVERALL HEIGHT)	0.57	14.4
G (TOP OF WELL DIA)	0.27	7.0
H (A-1 LOCATION) (X)	0.57	14.4
J (A-1 LOCATION) (Y)	0.44	11.2
K (WELL-TO-WELL SPACING)	0.35	9.0
L (WELL DEPTH)	0.45	11.3
M (BOTTOM OF WELL DISTANCE)	.09	2.2
N (FLANGE HEIGHT)	.10	2.5
P (BOTTOM OF WELL DIA)	.24	6.1

CATALOG NUMBER	SURFACE	COLOR	STERILE	UNITS PER PACK/CASE
269620	NON-TREATED	CLEAR	NO	5/60
269787	NON-TREATED	CLEAR	YES	1/50
439454	MAXISORP™	CLEAR	NO	5/60
442404	MAXISORP™	CLEAR	NO	5/60
475094	POLYSORP™	CLEAR	NO	5/60



รูปที่ 3.1 แสดงขนาดของ Nunc™ MicroWell™ 96-well, Collagen Type I-Treated, Flat-Bottom Microplate



รูปที่ 3.2 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top



โดยหลักการการทำงานนั้นจะให้ 96 well plate assay นั้นมีการเคลื่อนที่ในแกน X ข้อดีคือ ผู้ใช้งานสามารถติดตั้ง well plate assay เข้ากรอบได้ง่ายขึ้นเนื่องจากตำแหน่ง Home ของ IAI Table Top นั้นจะมีการเคลื่อนที่แกน X เข้าหาค่า  $X = 0$  ทำให้เป็นตำแหน่งที่ 96 well plate อยู่ในตำแหน่งใกล้มือของผู้ใช้งานมากที่สุด แต่ข้อเสียคือการเคลื่อนที่ Plate อาจจะทำให้ชิ้นงานที่ต้องการตรวจสอบเกิดการเคลื่อนที่จากตำแหน่งที่ต้องการทำให้เมื่อทำการตรวจสอบ ซึ่งอาจนำพามาซึ่งผลที่คลาดเคลื่อนได้

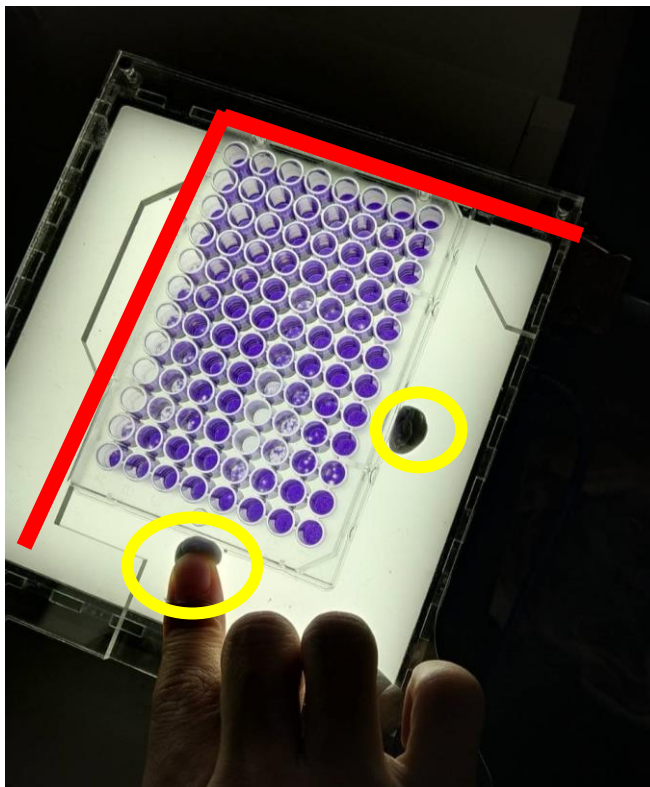
ส่วนในการเคลื่อนที่ในแกน Y และ Z นั้นจะทำการเคลื่อนที่ตัวกล้องที่ติดตั้งไว้ โดยในการเคลื่อนที่ในแนวแกน Y นั้นทำให้ Robot สามารถเคลื่อนกล้องเพื่อถ่ายรูปแต่ละหลุมในแนว Y ได้ ส่วนการเคลื่อนที่ในแนวแกน Z นั้นเพื่อปรับค่าขอบเขตการมองเห็นของกล้อง (Field of view) ข้อดีคือ สามารถทำให้การเก็บข้อมูลนั้น จะได้ข้อมูลที่ละเอียดที่มากที่สุดโดยการปรับให้ FOV ใกล้เคียงกับขนาดของหลุมทำให้การวิเคราะห์ได้ผลที่แม่นยำขึ้น สำหรับ 96 well plate แต่ในการปรับ FOV ให้ใกล้เคียงขนาดของหลุมนั้น ต้องทำการปรับโฟกัสเพื่อให้ภาพคมชัด

### 3.1.1 การจัดวาง

การออกแบบในวิทยานิพนธ์นี้ ระบบจัดจ้วางได้ออกแบบทั้งหมด 2 prototypes

#### 3.1.1.1 ระบบจัดวางโดยใช้กาวดินน้ำมัน

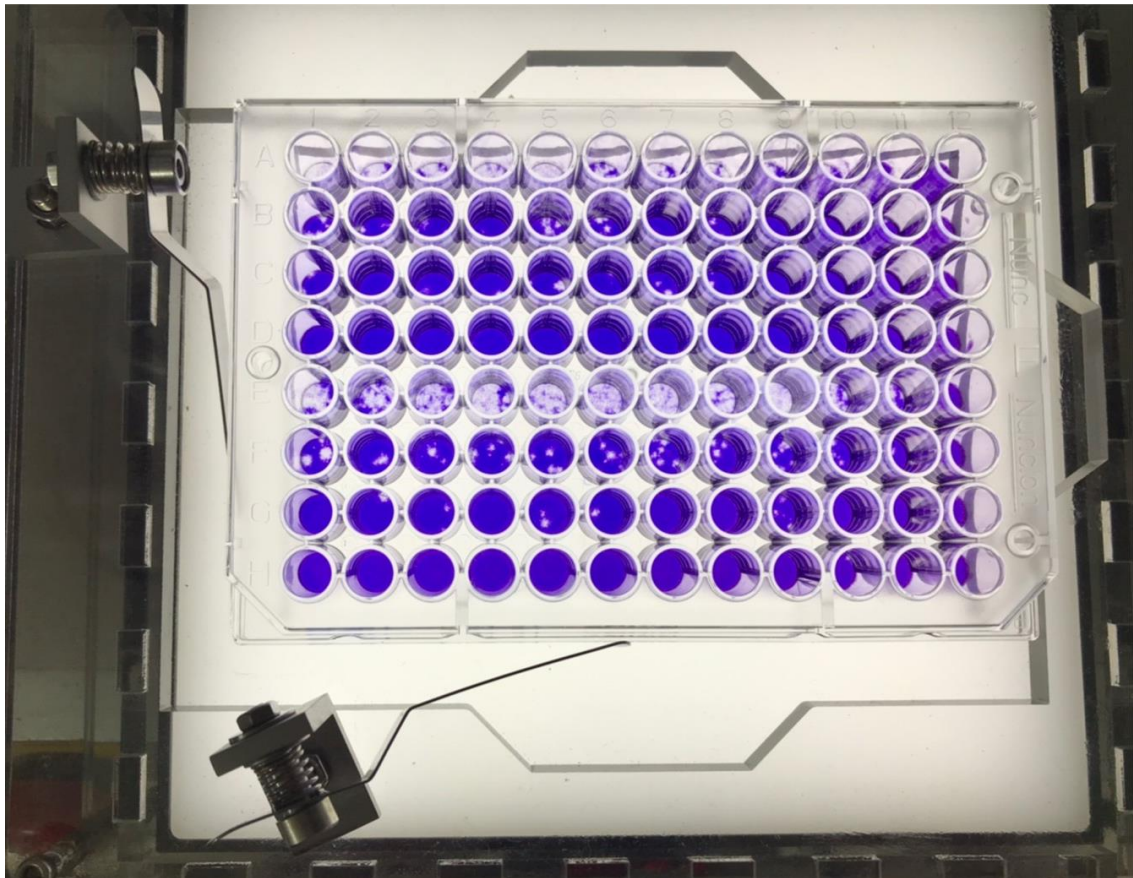
เพื่อป้องกัน well plate ไม่ให้เกิดการเคลื่อนที่ขณะทำการเก็บข้อมูล กลไกยึดจับ 96 well plate จึงถูกพัฒนาขึ้นโดยหลักการการออกแบบนั้นคือสามารถกด well plaque ให้เข้ายึดกับ Frameหลัก ดังแสดงเป็นเส้นสีแดง ดังรูปที่ 3.3 โดยในการสร้าง prototype แรกนั้นนั้นได้ทำการยึดโดยใช้กาวดินน้ำมันเพื่อให้สามารถเก็บข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์โดยได้ โดยข้อดีของการยึดจับด้วยกาวดินน้ำมันคือ สามารถทำได้ง่าย สะดวก แต่มีข้อเสียอยู่ที่การติดตั้งในแต่ละครั้งจะเกิด error จากการกดกาวดินน้ำมันด้วยน้ำหนักที่ไม่เท่ากัน



รูปที่ 3.3 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top

### 3.1.1.2 ระบบจัดวางเตยไซ Stage clip

เพื่อลด Error ของตำแหน่ง 96 well plate ที่เกิดจากการจับยึดด้วยดินน้ำมันด้วยแรงกดของผู้ใช้งานที่ไม่เท่ากัน การออกแบบตัวยึดจับที่เป็น Spring จึงช่วยให้แรงกดยึด Well plate มีแรงที่ใกล้เคียงกันในแต่ละครั้งในการใช้งาน ซึ่งจะทำการกดชิ้นงานทั้ง 2 ด้านเข้ากับมุมของฐานรองที่ทำขึ้นดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แสดงการจับยึด 96 well plate ด้วย Stage clip

### 3.1.2 การถ่ายภาพ

เพื่อให้การเก็บภาพมีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับการวิจัยนี้ จึงเลือกใช้กล้อง Digital Microscope เป็น USB Type เพื่อให้สะดวกในการติดตั้งกับคอมพิวเตอร์ชนิดต่างๆ โดยใช้กล้อง Dino lite microscope แสดงไว้ดังรูปที่ 3.5 ซึ่งเป็นกล้อง RGB 24 bits ความละเอียด 1.3 Megapixel (1280x1024) นอกจากนี้กล้องยังมีน้ำหนักที่เบา ซึ่งเป็นผลดีต่อความคมเนื่องจากมีค่า inertia ที่ต่ำส่วนข้อเสียของกล้องชนิดนี้คือไม่สามารถปรับโฟกัสโดยอัตโนมัติทำให้ในบางครั้งการปรับ Working distance ของชิ้นงาน อาจส่งผลต่อความชัดของวัตถุที่ต้องการตรวจสอบ

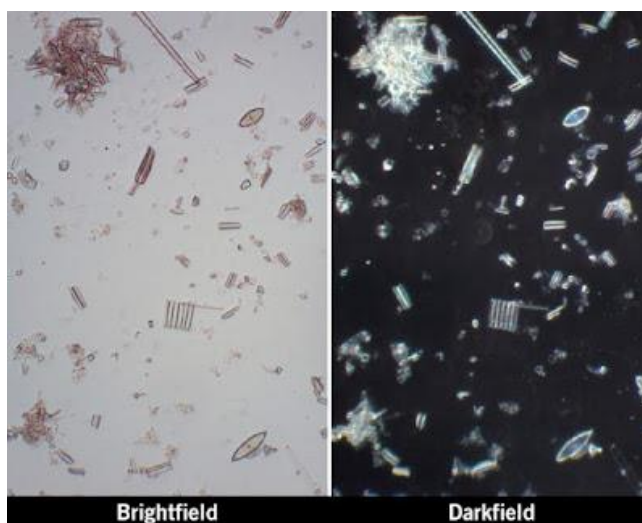


รูปที่ 3.5 กล้อง Dino-lite digital microscope Premier [17]

### 3.1.3 การจัดแสง

เพื่อให้การเก็บข้อมูลในแต่ละครั้งได้ข้อมูลได้ที่มีความใกล้เคียงและมีคุณภาพของภาพดีที่สุด การจัด Lighting จึงมีความจำเป็นในงานวิจัยนี้ โดย Lighting จะช่วยให้เพิ่มรายละเอียดของข้อมูลที่ต้องการตรวจสอบรวมถึงลดความผิดพลาดของแสงที่ไม่สม่ำเสมอของข้อมูล

เทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ Back Lighting [18] [19] (การจัดเรียงตัวกำเนิดแสงอยู่ฝั่งตรงข้ามกับกล้อง โดยให้วัตถุที่สนใจอยู่ตรงกลางระหว่างต้นกำเนิดแสงกับกล้อง) ซึ่งเมื่อจัดแสงแบบ Backlighting จะทำให้ Lighting สามารถส่องแสงขนานกับวัตถุที่พิจารณาได้หรือก็คือ parallelism light โดยภาพที่ได้จะมีลักษณะเป็น Bright field หรือก็คือภาพที่ได้มีฉากหลังที่เป็นสีขาว และมีวัตถุที่สนใจเป็นสีที่เข้มออกมาจากฉากหลังดังรูปที่ 3.6 แสดงตัวอย่างการจัดแสงแบบ Bright field และ Dark Field



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างการจัดแสงแบบ *Bright field* และ *Dark Field* [20]

### 3.1.3.1 parallelism light

parallelism light คือ ความขนานของแสงซึ่งขึ้นระยะห่างของต้นกำเนิดแสงและวัตถุที่ต้องการสนใจ [4] ได้แสดงตัวอย่างการถ่ายภาพด้วยแสง Backlight ที่จัดให้ต้นกำเนิดแสงอยู่ใกล้กับจัดแสง Backlight ให้อยู่ห่างจากวัตถุพบว่าผลภาพที่ถ่ายจาก Backlight ที่ระยะใกล้ค่า Contrast ที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับ Backlight ที่ระยะทางที่ไกลกว่าซึ่งให้ผลที่แสงของวัตถุมืดส่วนที่ค่อยๆไล่แสงทำให้การทำไปวิเคราะห์ทำได้ยากขึ้น เพื่อให้ได้แสง parallelism จึงเลือกต้นกำเนิดแสงเป็น light panel ดังรูปที่ 3-5



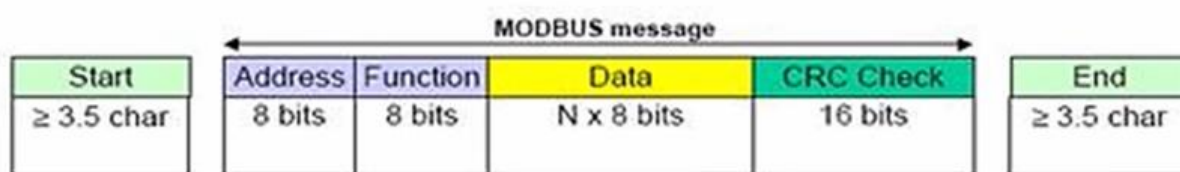
รูปที่ 3.7 LED Light panel สำหรับ Backlighting

### 3.1.5 การออกแบบระบบโปรแกรมส่วนติดต่อระหว่างผู้ใช้กับระบบและประสบการณ์ของผู้ใช้งาน

ในการออกแบบระบบโปรแกรม UX/UI นั้นทำบน Visual studio window form application C# โดยจุดประสงค์หลักเพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถควบคุมและเก็บข้อมูลโดยสั่งการได้ผ่านโปรแกรม โดยการใช้ออกแบบระบบจะแบบเป็น 2 ส่วน 1. การควบคุม Robot IAI ผ่านโปรแกรม Window form application C# 2. การสั่งการในโปรแกรม

### 3.1.6 การควบคุม Robot IAI ผ่านโปรแกรม window form application C#

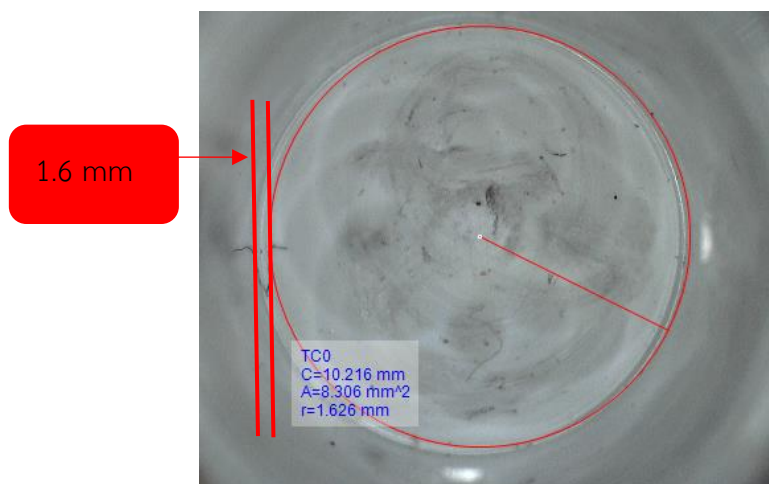
การสั่งการจากคอมพิวเตอร์ไปยัง Robot IAI นั้นสามารถสั่งการได้ผ่าน serial communication โดยการต่อสายจาก port USB จากคอมพิวเตอร์ไปยัง Port USB ของ IAI Table Top โดยการสั่งการจะสั่งโดยใช้ Modbus Communication โดยจะมีชุดข้อมูลแสดงดังรูปที่ 3.8 โดยทุกครั้งที่ส่งไปจะมีการตรวจสอบว่าโค้ดที่ส่งไปมีความถูกต้องโดยการใช้ Check Sum ต่อท้ายในหลายๆคำสั่ง



รูปที่ 3.8 แสดงชุดคำสั่งสำหรับสั่งการ IAI Table Top [21]

สำหรับการ Check Sum นั้นทำโดยการแปลงตัวอักษรทุกตัวมาแปลงจาก ASCII เป็นเลขฐาน 16 แล้วนำค่าทั้งหมดมารวมกันและค่า Check Sum ของคำสั่งนั้นๆจะมีค่าเท่ากับผลรวม 2 ตัวสุดท้าย

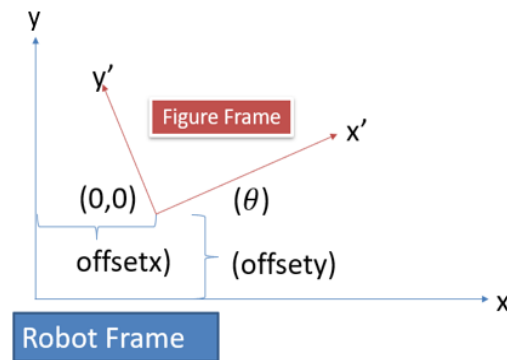
เมื่อทำการเขียนโปรแกรมเพื่อสั่งการให้ Robot IAI เมื่อที่จากตำแหน่ง A12 ไปยัง H1 ของ well plaque assay พบว่า ระยะจากการสั่งการกับระยะที่เคลื่อนที่จริงๆ มีค่าความคลาดเคลื่อนไปจากการคำนวณ ดังแสดงดังรูปที่ 3.9 แสดงระยะที่เคลื่อนที่ไปของตำแหน่งของวงกลมที่ตำแหน่ง H1 ไปในเป็นระยะโดยประมาณ 1.6 mm



รูปที่ 3.9 แสดงระยะที่เกิดการคลาดเคลื่อนไปของวงกลมเมื่อทำการเคลื่อนที่จาก A12 ไป H1

โดยเมื่อสืบค้นที่มาของสาเหตุนี้พบว่า การคลาดเคลื่อนเกิดจากในการติดตั้ง จริงๆนั้นแกนอ้างอิงของหุ่นยนต์กับแกนอ้างอิงของ well plaque assay นั้นมีมุมที่ต่างกันอยู่ซึ่งเกิดได้จากการติดตั้งเสมอ

ดังนั้นในการสั่งการหุ่นยนต์นั้นจำเป็นต้องมีการ Calibration หุ่นยนต์เพื่อปรับแกนอ้างอิงของแกน Robot IAI และ แกนของ Well plate assay ให้อยู่ในแนวเดียวกัน โดยสามารถ Calibration ได้โดยพิจารณาการเทียบการหมุนแกนอ้างอิงได้ดังสมการที่ 3.1 ดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.100 แสดงแกนอ้างอิงของ IAI Table Top

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) & \text{offsetX} \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) & \text{offsetY} \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x' \\ y' \\ 1 \end{bmatrix} \quad \text{สมการที่ (3.1)}$$

โดย  $x, y$  คือค่าของแกนของ Robot IAI

$x', y'$  คือค่าของแกนของ Figure (well plate assay)

OffsetX คือค่าความต่างของจุดกำเนิดระหว่างแกนของ Robot และ Figure ตามแกน X

OffsetY คือค่าความต่างของจุดกำเนิดระหว่างแกนของ Robot และ Figure ตามแกน Y

### 3.2. การสั่งการในโปรแกรม

ในการออกแบบโปรแกรมนั้นออกแบบ UX/UI นั้นออกแบบตาม User Interface and User Experience (UI/UX) Design [16] ได้ให้ไว้

#### 3.2.1 ออกแบบ UX

การออกแบบระบบโต้ตอบให้ผู้ใช้สามารถรับรู้และตีความการโต้ตอบได้ โดย Norman [22] ได้นำเสนอกรอบในการทำงาน ซึ่งช่วยในการกำหนดแนวคิดการโต้ตอบของโปรแกรมบนระบบที่จะออกแบบโดยแยกส่วนในการโต้ตอบออกเป็น 7 ลำดับ ซึ่งเมื่อนำสิ่งที่ผู้ใช้จำเป็นต้องใช้งานในโปรแกรมซึ่งแบ่งเป็น 3 หน้าที่หลักๆคือ (1) ทำการเก็บข้อมูล (2) ทำการวิเคราะห์ข้อมูล (3) สามารถหยุดทำงานได้โดยกระทันหัน (Emergency stop) มาออกแบบตามหลักของ Norman จะได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 3.1



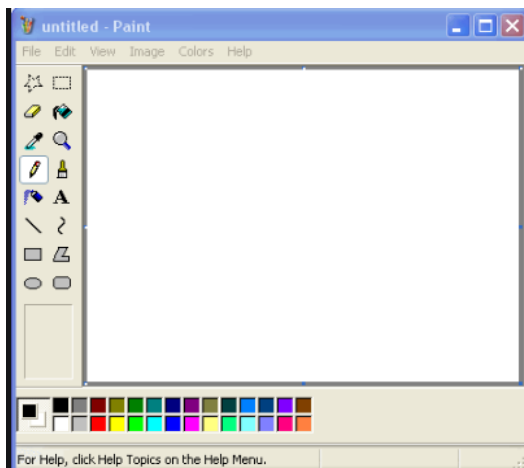
ตารางที่ 3.1 แสดงแนวคิดการออกแบบ UX ของ Norman มาใช้งานเพื่อหาแนวทางในการออกแบบ

Stage	ทำการเก็บข้อมูล	ทำการวิเคราะห์ข้อมูล	หยุดเครื่องกะทันหัน
Forming the Goal	“I want to collect the assay image”	“I want to analyze image”	“I want to stop machine immediately”
Forming the Intention	“I will collect 24/96 well assay image”	“I will analyze the images in the Folder”	“I will find the stop button to stop all processes”
Specifying an action	“I select the assay model in Combo box and set the connection’s properties”	“I set the image’s folder and the properties to analyze”	“I will use the mouse to stop the processes”
Executing an action	“I click the mouse on the Start button to start collect image”	“I click on “Test” button to test the result”/” I click start button to analyze all result”	“I click on “Stop” button to stop the processes”
Perceiving the System State	“I see the image appear on the screen”/ “I see the pop-up message on the screen “Please Connect to Robot”	“I see the result appear on the screen”	“I see the pop-up message “Stop””
Interpreting the System State	“I think the image collect will finish when live video stop moving”/ “I think I insert wrong property”	“I think analyzing is now finish”	“I think all process is stopped now”
Evaluating the Outcome	“I will now need to save the image to Folder”	“I will now need to save the analyzed image to Folder”	“I will reset in property”

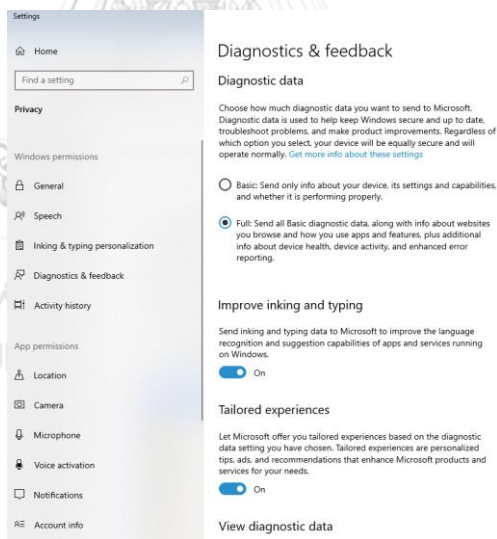
### 3.2.2 ออกแบบ GUI

ในการออกแบบ GUI นั้นจะทำการออกแบบให้ผู้ใช้งานคุ้นเคยกับ UI โดยจะให้การตั้งค่า property นั้นอยู่ทางด้านซ้ายมือของโปรแกรม โดยจะเรียงลำดับการตั้งค่าจากบนลงล่าง และทางด้านขวาของโปรแกรมเป็นส่วนที่แสดงผลลัพธ์ ซึ่งการออกแบบเช่นนี้เป็นการออกแบบในลักษณะ

เช่นเดียวกับโปรแกรม Paint และรวมถึงการตั้งค่าใน window ดังรูปที่ 3.11 และ 3.12 ซึ่งจะเป็นลักษณะที่ผู้ใช้คอมพิวเตอร์คุ้นเคยกัน



รูปที่ 3.11 แสดงตัวอย่างโปรแกรมที่ออกแบบโดยใช้เทคนิคให้การตั้งค่าอยู่ซ้ายมือและผลลัพธ์อยู่ด้านขวามือ



รูปที่ 3.12 แสดงตัวอย่างโปรแกรมที่ออกแบบโดยใช้เทคนิคให้การตั้งค่าอยู่ซ้ายมือและผลลัพธ์อยู่ด้านขวามือ

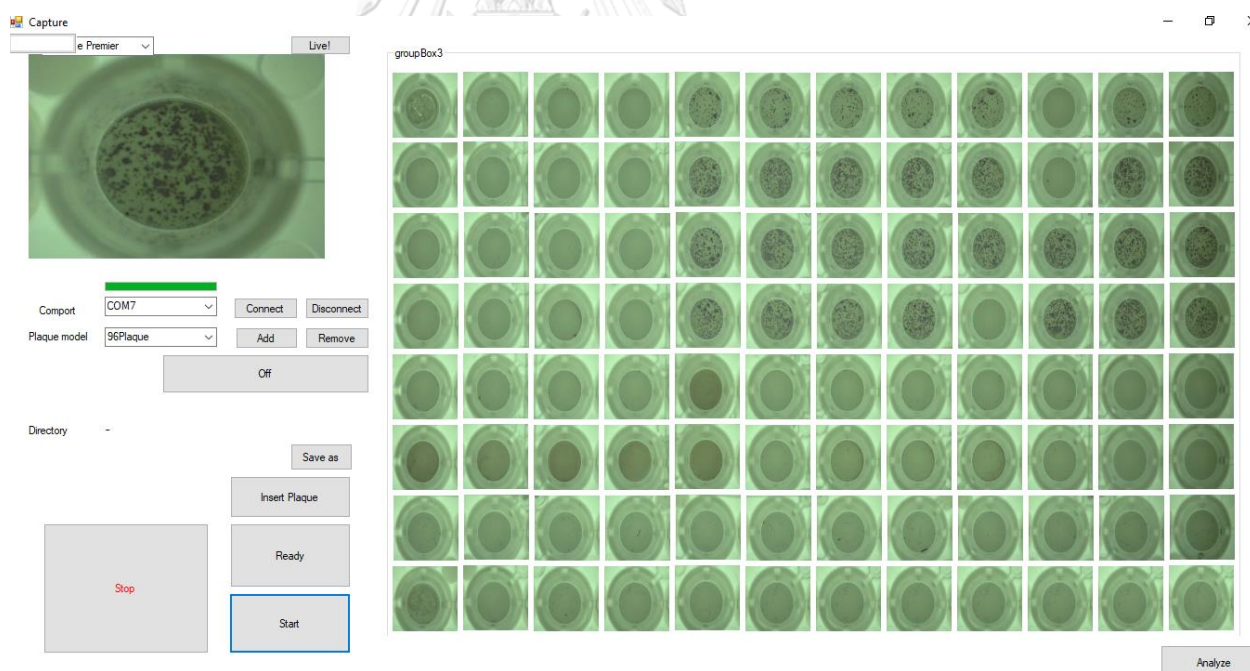
หลังจากได้ UX และแนวทางในการออกแบบ GUI ที่ผู้ใช้งานควรได้รับแล้วจึงทำการออกแบบหน้าต่าง UI โดยแบบหน้าต่างการควบคุมออกเป็น 3 หน้า

### 3.2.2.1. หน้าต่างสำหรับจัดเก็บข้อมูล (Collecting data page)

หน้าที่หลักของหน้าต่างนี้คือ สามารถสั่งการเพื่อถ่ายรูปในแต่ละหลุมของ 96 Well plate assay และสามารถบันทึกผลได้ โดยเงื่อนไขที่ต้องมีเพื่อสามารถทำงานครบหน้าที่หลักนี้คือ

1. เชื่อมต่อกับหุ่นยนต์ผ่าน Serial port ได้
2. สามารถเลือกและแก้ไขโมเดลได้
3. สามารถสั่งเก็บข้อมูลได้
4. มีหน้าจอแสดงผล

ซึ่งเมื่อทำการออกแบบจะได้หน้าต่าง Collecting data page ดังรูปที่ 3.13 ส่วนที่ 1 ด้านซ้ายถูกใช้สำหรับ เชื่อมต่อกับหุ่นยนต์ และ ปรับ Model ที่ใช้ในการถ่าย ส่วนที่ 2 ด้านขวาเป็นส่วนที่ใช้ในการจัดเก็บข้อมูล และ ส่วนที่ 4.1 และ 4.2 ถูกใช้ในการแสดงภาพข้อมูลที่บันทึก



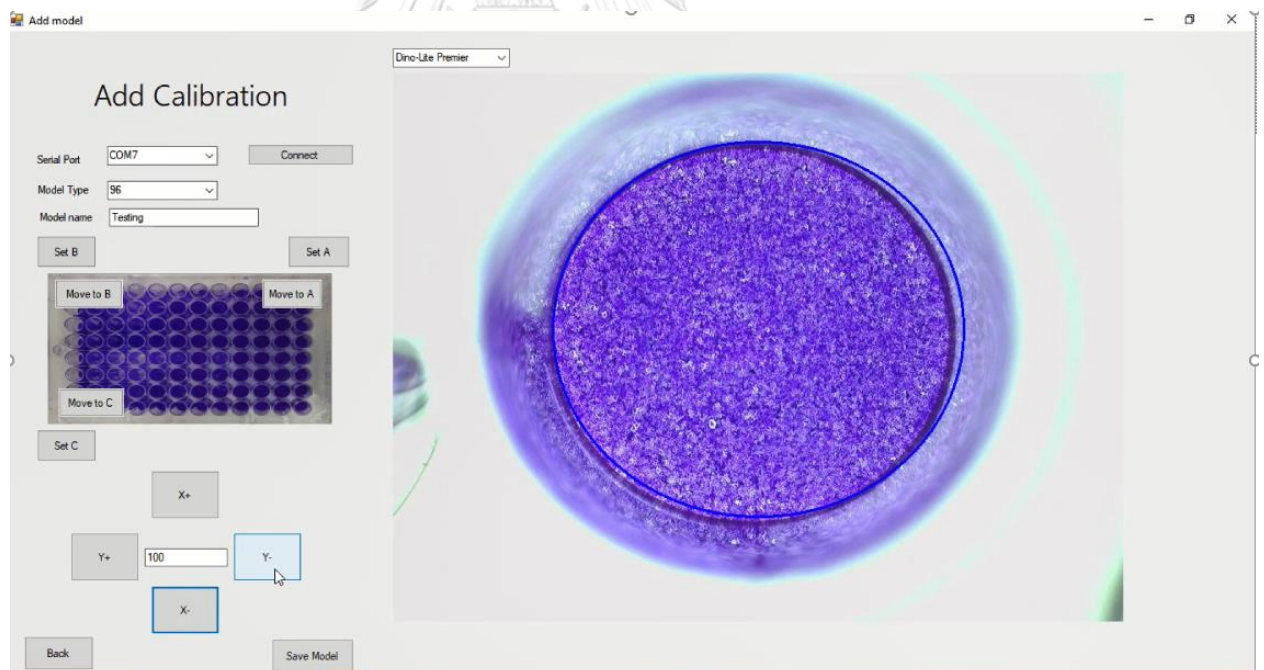
รูปที่ 3.13 แสดงหน้าต่างของ Collecting page

### 3.2.2.2. หน้าต่างสำหรับเพื่อ Model (Calibration page)

โดยหน้าที่หลักของหน้าต่างนี้คือ กำหนดจุดทั้ง 3 เพื่อใช้ในการ Calibration แกนอ้างอิงในการเคลื่อนที่โดยมีเงื่อนไขในการทำงานให้ครบที่กำหนดคือ

1. เชื่อมต่อกับหุ่นยนต์ผ่าน Serial port ได้
2. กำหนดชื่อและชนิดของ Model ที่จะนำมา Calibration
3. สิ่งเคลื่อนที่ end effector ของแต่ละแกนได้
4. บันทึกค่าตำแหน่งที่ต้องการได้
5. บันทึกชื่อ Model ที่ต้องการได้

ซึ่งเมื่อทำการออกแบบจะได้หน้าต่าง Calibration page ดังรูปที่ 3.14 ส่วนที่ 1 ด้านซ้ายถูกใช้สำหรับเชื่อมต่อหุ่นยนต์ และ ปรับ model ที่ต้องการ Calibration ส่วนที่ 2 ด้านขวาถูกใช้เพื่อปรับตำแหน่งของกล้อง ส่วนที่ 3 ด้านล่างซ้ายใช้สำหรับบันทึกค่าการปรับ model



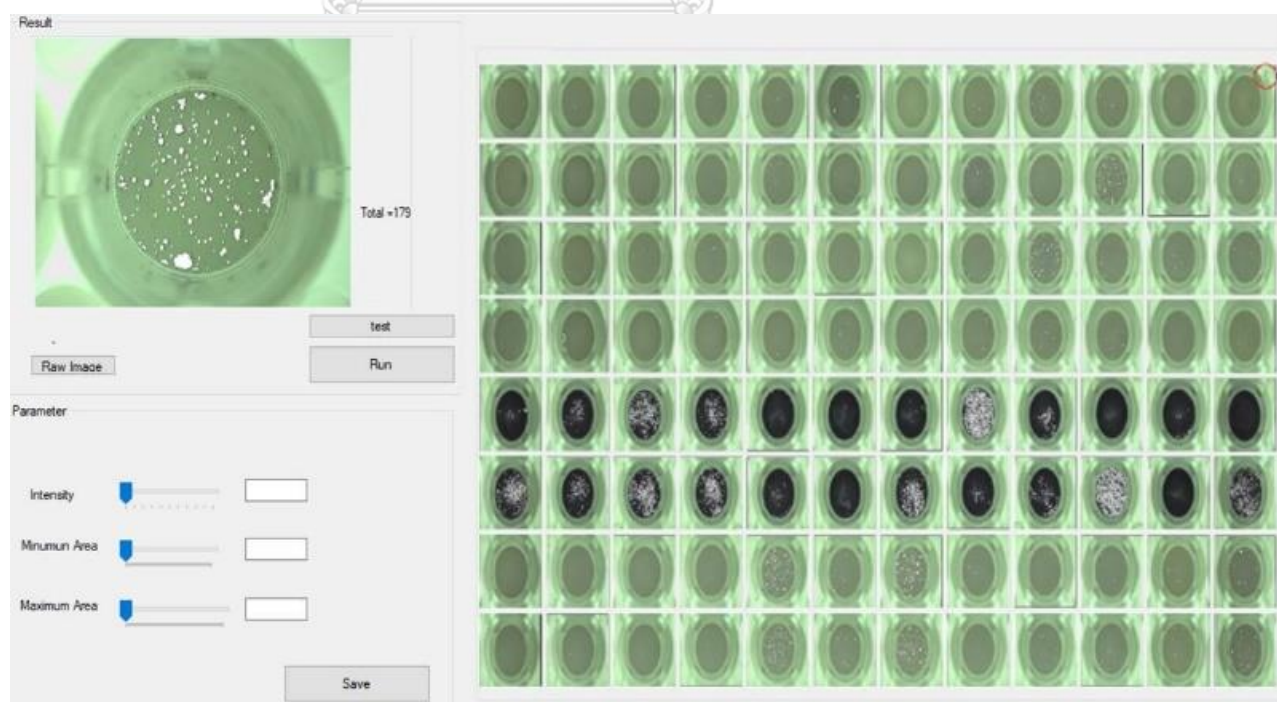
รูปที่ 3.14 แสดงหน้าต่างของ Calibration page

### 3.2.2.3. หน้าต่างสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล (Analyzing page)

โดยหน้าที่หลักของหน้าต่างนี้คือ ตรวจสอบผลวิเคราะห์ตามค่าที่ต้องการได้ โดยเงื่อนไขที่สามารถทำงานได้คือ

1. สามารถเลือกเซตข้อมูลที่จะวิเคราะห์ได้
2. สามารถตั้งค่าที่จะใช้ในการวิเคราะห์ได้
3. สามารถกดวิเคราะห์ข้อมูลได้
4. สามารถบันทึกข้อมูลได้

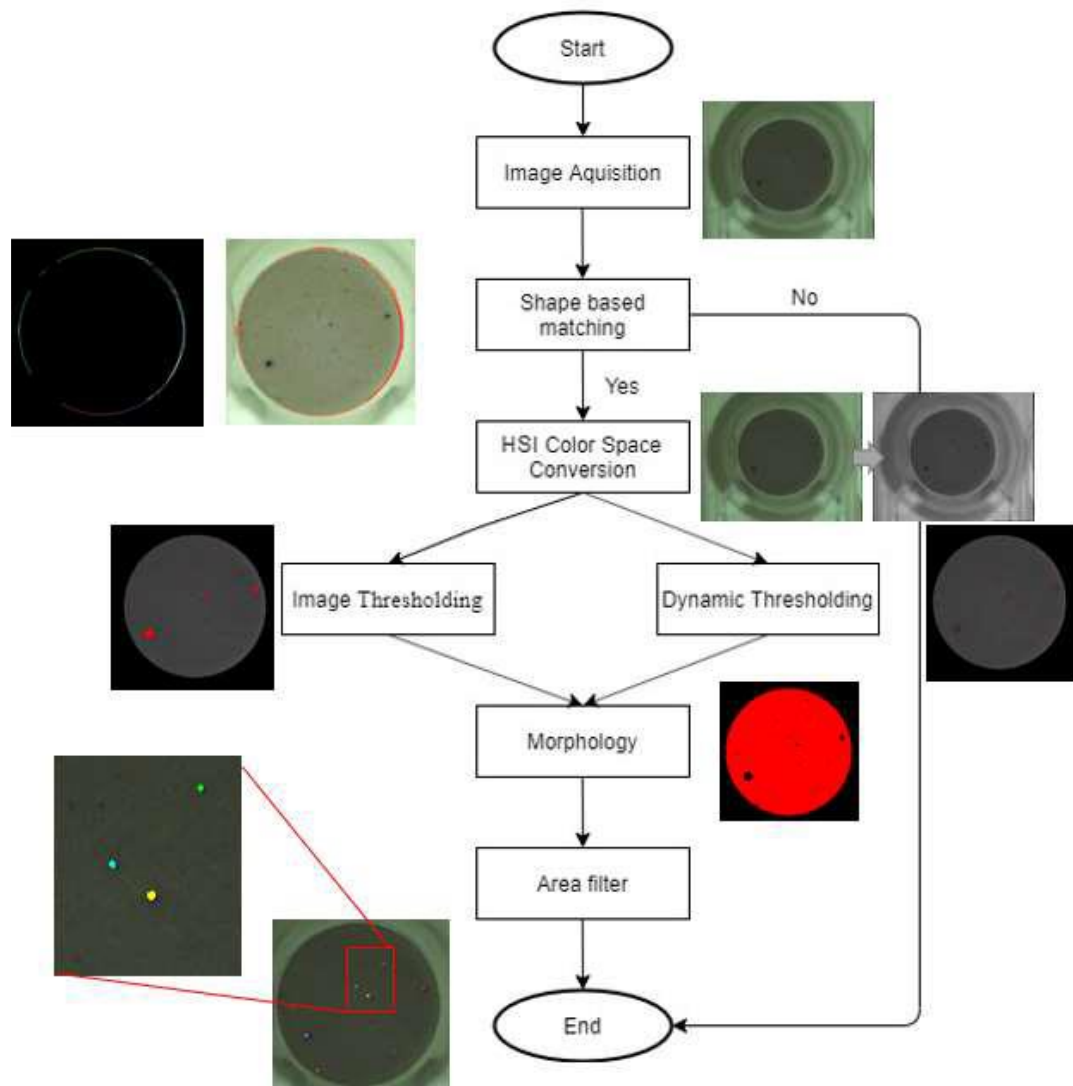
ซึ่งเมื่อทำการออกแบบจะได้หน้าต่าง Analyzing page ดังรูปที่ 3.15 ส่วนที่ 1 ด้านซ้ายบนแสดงตัวอย่างที่ได้จากการนับด้วย Parameter ที่ User เป็นผู้กำหนดเพื่อทดสอบการจูนโปรแกรมการนับ ส่วนที่ 2 ด้านล่างซ้ายเป็นส่วนที่ถูกใช้ในการปรับค่า Parameter ในการนับ และ ส่วนที่ 3 ด้านขวาถูกใช้เพื่อแสดงผลที่ได้จากการนับกับรูปภาพทั้ง 96 รูป ในการวิเคราะห์และตรวจสอบภาพนั้นมีหลักการคือ ปรับปรุงคุณภาพของภาพต้นฉบับให้มีข้อมูลที่ชัดเจนที่มากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมต่อกระบวนการนับแยก ซึ่งใช้คอมพิวเตอร์ในการทำงาน โดยการปรับปรุงคุณภาพทำได้โดย



รูปที่ 3.15 แสดงหน้าต่าง Analyzing page

### 3.3 ระเบียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ELISpot(The enzyme-linked immune absorbent spot)

ระเบียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ELISpot ด้วยรูปภาพสามารถทำได้ดังแผนภาพดังรูปที่ 3.16 โดยจะมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้



รูปที่ 3.166 แผนภาพระเบียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ELISpot

### 3.3.1 Image shape base matching

เพื่อให้สามารถระบุตำแหน่งของ Well plate ในงานวิจัยนี้ กระบวนการสร้างเส้นรูปร่างของ Well plate ได้ง่ายขั้นตอนแรกคือการทำแปลงรูปภาพจาก RGB Image เป็น Grey scale value image

#### 3.3.1.1 Image conversion

การแปลงข้อมูลจากภาพสี (RGB) เป็นภาพระดับสีเทา (Gray scale image) เพื่อให้ข้อมูลในภาพมีความแตกต่างที่มากขึ้นโดยสามารถแปลงได้จากสมการที่ 3.22

$$Grayscale = \frac{R + G + B}{3}$$

สมการที่ 3.2

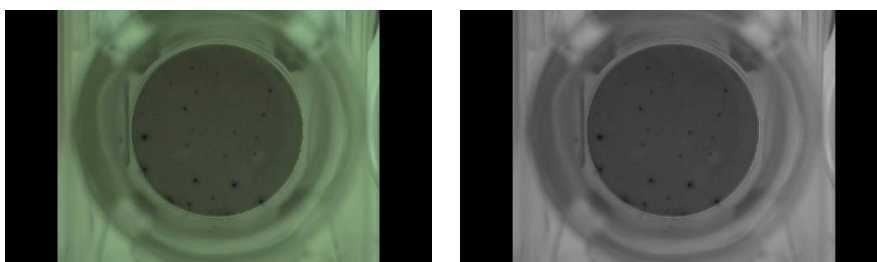
นอกจากนี้หากข้อมูลในภาพมีการผสมสีในบางสีที่มากเกินไป สามารถใช้กระบวนการ luminosity method ได้เช่นกันซึ่งหลักการนั่นคือ การค่าน้ำหนักความสำคัญของแต่ละสีต่างกัน เช่น หากใช้ความสำคัญสีแดงจะเป็นดังสมการที่ 3.3

35% สีเขียว 20% สีฟ้า 45% จะสามารถคำนวณหาค่า

$$ColorValue = (0.35 \times R) + (0.2 \times G) + (0.45 \times B)$$

สมการที่ 3.3

โดยรูปที่ 3.17 แสดงรูปที่ก่อนทำการแปลงรูปภาพของ Well plate จาก color image เป็น Gray Scale image



รูปที่ 3.17 Well plate ก่อนแปลงภาพจาก color image เป็น Gray Scale Image

### 3.3.1.2 Create the model

ในการเริ่มโปรแกรมการตรวจสอบ สิ่งแรกที่สำคัญในการเริ่มนับคือระบุขอบเขตของวัตถุที่สนใจหรือก็คือพื้นที่ของ Well plate เนื่องจากชุดข้อมูลแต่ละ Well plate จะมีความคลาดเคลื่อนในการถ่ายรูป ทำให้จุดศูนย์กลางของ Well plate เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้น เพื่อลด Error ที่เกิดขึ้นของการกำหนดขอบเขตการตรวจสอบจึงจำเป็นต้องมีการระบุตำแหน่งของ Well plate ในรูปภาพ ซึ่งกระบวนการระบุตำแหน่งของตำแหน่งที่เป็นที่นิยมคือการทำ Shape Base Matching และ Pattern Matching

#### **Shape Base Matching**

Shape-base Matching เป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งที่นิยมใช้ในการทำงานในด้าน Machine vision นั่นคือการจดจำลักษณะรูปร่างเส้นของขอบวัตถุโดยไม่ได้พิจารณาถึงรายละเอียดสีของวัตถุที่สนใจมักนิยมนำมาใช้กับงานที่มีเส้นขอบที่ชัดเจน

#### **Pattern Matching**

Pattern Matching เป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่นิยมใช้ในการทำงานในด้าน Machine vision นั่นคือทำการจดจำรายละเอียดของวัตถุ ตั้งขอบเส้น แล้วสีภาพในของวัตถุเพื่อใช้ในการตรวจสอบวัตถุชนิดอื่นๆต่อไป มันจะนิยมนำมาใช้กับงานที่มีลักษณะสีที่แตกต่างกัน

ทำการสร้าง Model ที่สนใจโดยการใช้ฟังก์ชัน `create_shape_model` โดยจะมีค่าที่ใช้ในการตั้งค่าเพื่อทำการตรวจสอบที่สำคัญดังนี้

Pyramid คือค่าที่ใช้ในการลด Sample ของรูปภาพให้เล็กลงเพื่อให้โปรแกรมสามารถทำงานได้เร็วขึ้น เช่น

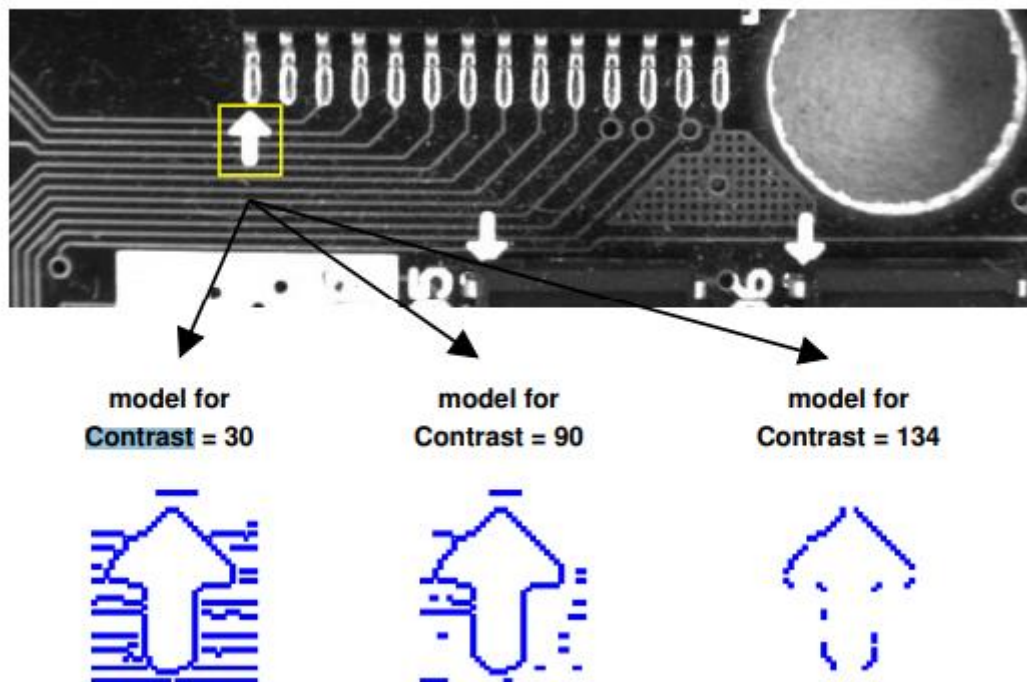
- รูปภาพตั้งต้น มีค่าระดับ pyramid ที่ 1 มีขนาด 600 x 400 ถ้า รูปภาพมีระดับ pyramid ที่ 2 มีขนาด 300 x 200 และ pyramid ที่ 3 จะมีขนาด 150 x 100 ดังรูปที่ 3.18 โดยส่วนมากการ Search model จะนิยมไล่จาก pyramid level ที่มากไปหาน้อย เพื่อลดเวลาในการตรวจสอบหาวัตถุ





รูปที่ 3.18 เปรียบเทียบการแปลงค่า Pyramid Image ที่ 1 ไป 4

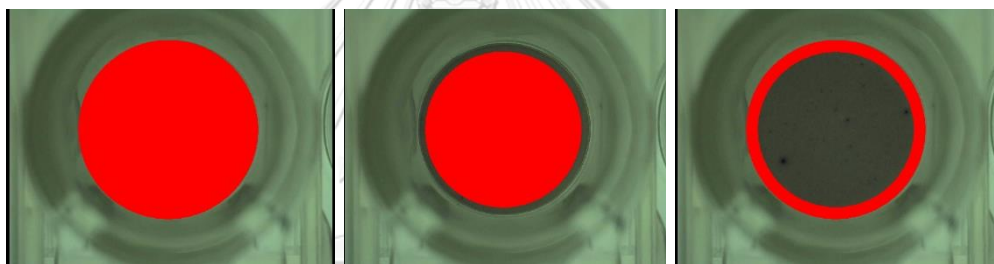
Contrast คือค่าความต่างกันของค่าความเข้มของรูปภาพ โดยการที่ค่า Contrast มากจะทำให้โปรแกรมแยก model ที่มีค่าความต่างของความเข้มที่มากออกมาได้แต่หากค่า Contrast ของโปรแกรมมีค่าน้อย โปรแกรมจะดึงรายละเอียดพื้นที่ที่มีค่าความต่างกันของความเข้มสีน้อยมาพิจารณาในการสร้าง Model ดังเช่นรูปที่ 3.19 จะพบว่าที่ค่า Contrast ที่ 30 โปรแกรมจะดึงรายละเอียดของ ข้อมูลจากหลังมากด้วย ส่วนค่าcontrast 90 และ 134 โปรแกรมจะทำการดึงข้อมูลออกมาแค่ส่วนที่มีค่าความต่างความเข้มที่มองเห็นได้ชัด



รูปที่ 3.19 เปรียบเทียบการสร้าง model จากค่า Contrast ที่มากและน้อย

- MinContrast ความหมายจะเหมือนกับค่า Contrast แต่ต่างตรงเป็นค่าความต่างของความเข้มภาพที่ใช้ในการพิจารณาในการตรวจสอบหาวัตถุ
- AngleStep ระหว่างทำการตรวจสอบหา Model ที่สนใจโปรแกรมจะทำการตรวจสอบหาวัตถุที่การวางมุมต่างๆ ในช่วยที่ผู้ทำโปรแกรมกำหนดไว้ โดยว่า Angle คือค่าที่ใช้ในการระบุความละเอียดในการตรวจสอบหาวัตถุที่มุมต่างๆ โดยการที่ค่า Angle Step มีค่าสูงก็จะทำให้โปรแกรมทำงานได้เร็วขึ้น

โดยหลังจากได้ Grey scale image แล้วสามารถทำการสร้าง Model เพื่อตรวจสอบหาตำแหน่ง Well plate ได้โดยการระบุตำแหน่ง ROI ของภาพ Gray value Image โดยพื้นที่ส่วนที่สนใจของวัตถุคือขอบของ well plate ซึ่งจะจัดเตรียมลักษณะวงแหวนดังรูปที่ 3.20 โดยในการระบุพื้นที่ที่สนใจสามารถทำได้โดยการระบุรัศมีวงนอก และรัศมีวงใน แล้วทำการ Difference domain ของพื้นที่ทั้งสองจะทำได้สามารถได้พื้นที่ ROI



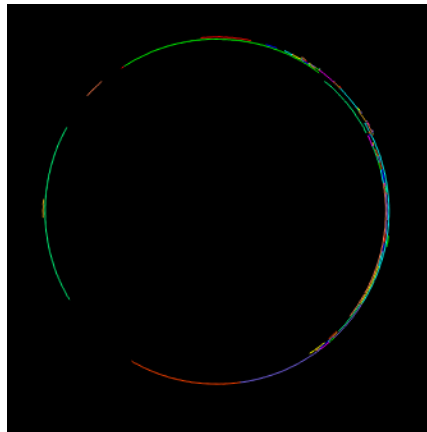
รูปที่ 3.20 การกำหนด Region เพื่อระบุพื้นที่ที่สนใจเป็นรูปแหวน

เมื่อทำการระบุ ROI รูปวงแหวนได้เรียบร้อยแล้วขั้นตอนถัดไปคือการครอบรูปให้เหลือแต่ Feature ที่ต้องการใช้ในการทำ Model ในการระบุตำแหน่งของขอบของ Well plate จะได้ข้อมูลภาพดังรูป 3.21



รูปที่ 3.21 Feature ที่ถูกนำมาใช้ในการทำ model

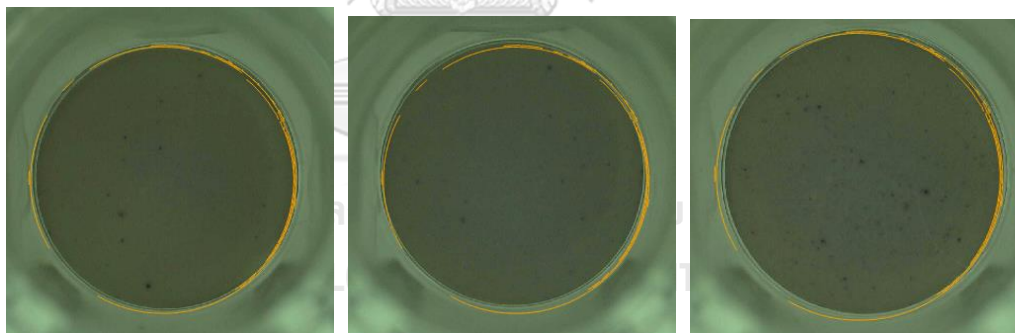
โดยเมื่อทำการ Create Model จาก Well plate จะได้ข้อมูล XLD ดังรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.22 XLD จากการ Create Model จาก Well Plate

### 3.3.2 Find the object again

เมื่อทำการ create model เสร็จ ขั้นตอนถัดไปคือการทดสอบความสามารถของการตรวจสอบหาตำแหน่งของ well plate แต่ละภาพว่าสามารถทำงานได้หรือไม่โดยการทดสอบใช้คำสั่ง `find_shape_model` เพื่อหา model ที่ได้ทำการสร้างขึ้นในรูปภาพต่างๆ ซึ่งหากโปรแกรมไม่สามารถหาตำแหน่งของ Well plate ได้ทุกรูปให้กลับไปทำการสร้าง model ใหม่แล้วทำการทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถของโปรแกรมตรวจสอบหาตำแหน่งของกลุ่มดังรูปที่ 3.23



รูปที่ 3.23 แสดงการทดสอบนำ Model ที่ได้จากการสร้างมาทดสอบกับรูปขึ้นต่างๆ

### 3.3.3 Alignment image

เมื่อโปรแกรมสามารถระบุจุดกึ่งกลางของ Well plate ได้แล้ว ขั้นตอนถัดมาคือการทำ Alignment image หรือก็คือการปรับให้จุดศูนย์กลางของ well plate มาจุดที่จุดอ้างอิงในการทำโปรแกรมเพื่อให้ง่ายต่อการระบุพื้นที่ฐานของกลุ่มในการตรวจสอบ โดยจะทำการแปลงโดยใช้คำสั่ง `hom_mat2d_translate` เพื่อทำการเลื่อนตำแหน่งของรูปภาพตามแกนนอนและแกนตั้ง และ `hom_mat2d_rotate` เพื่อทำการเลื่อนรูปภาพตั้งต้นโดยจะเป็นการแปลงในลักษณะหมุนรอบจุดอ้างอิง โดยทั้งสองคำสั่งนี้มีหลักการการทำงานคือแปลง Matric รูปภาพด้วย Matric Transform

ดังสมการที่ 3.4 เป็น Matric ในการแปลงภาพในลักษณะเลื่อนตำแหน่ง, สมการที่ 3.5 เป็น Matric ในการ และจะได้ผลลัพธ์ดังรูปที่ 3.24 และ 3.25

$$\text{HomMat2DTranslate} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & t_x \\ 0 & 1 & t_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \text{HomMat2D} \quad \mathbf{t} = \begin{pmatrix} T_x \\ T_y \end{pmatrix}$$

สมการที่ 3.4

โดย  $T_x$  คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงในแนวแกนระนาบ

$T_y$  คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงในแนวแกนตั้ง



$$\text{HomMat2DRotate} = \begin{bmatrix} \mathbf{R} & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \text{HomMat2D} \quad \mathbf{R} = \begin{bmatrix} \cos(\text{Phi}) & -\sin(\text{Phi}) \\ \sin(\text{Phi}) & \cos(\text{Phi}) \end{bmatrix}$$



$$\text{HomMat2DRotate} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & +P_x \\ 0 & 1 & +P_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mathbf{R} & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 & -P_x \\ 0 & 1 & -P_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \text{HomMat2D}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

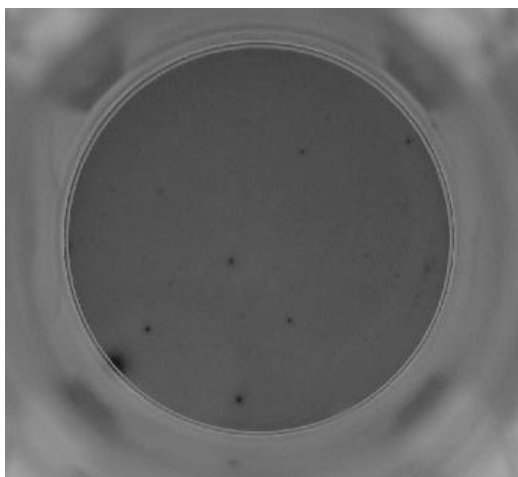
สมการ 3.5

CHULALONGKORN UNIVERSITY

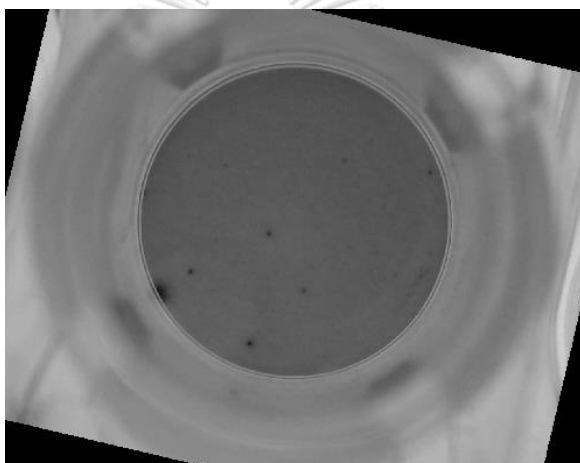
โดย  $\text{Phi}$  คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงของมุมในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา

$P_x$  คือ ค่าจุดศูนย์กลางแกนระนาบของการแปลงการหมุนของมุม

$P_y$  คือ ค่าจุดศูนย์กลางแกนตั้งของการแปลงการหมุนของมุม



รูปที่ 3.24 Well plate ก่อนทำการ Alignment Image



รูปที่ 3.25 Well plate หลังทำการ Alignment Image

### 3.3.4 Image RGB conversion to HSI image

เนื่องด้วยข้อมูล RGB เป็นข้อมูลที่ได้รับผลกระทบจากความสว่างของแสงที่ได้รับ ทำให้ข้อมูลอาจมีความคลาดเคลื่อนไปจากกรณีที่แหล่งกำเนิดแสงให้ได้ไม่สม่ำเสมอการแปลงข้อมูลเป็น HIS (Hue Sat Intensity) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการแปลงข้อมูลเพื่อให้ได้ข้อมูลของความเข้มของภาพที่ง่ายต่อการวิเคราะห์มากขึ้น

### 3.3.5 Image thresholding

Image thresholding คือกระบวนการในการแปลงภาพจากภาพระดับสีเทา (Gray scale image) ไปเป็นภาพขาวดำ (Binary image) เพื่อใช้ในการแยกข้อมูลออกจากพื้นหลัง (Background) โดยหลักการการแปลงได้นั้นทำได้โดยการเทียบค่าระดับสีเทา (Gray value) ของแต่ละพิกเซลกับค่า T ดังสมการที่ 3.6

$$Bi = \begin{cases} 255 & \text{if } (g(x,y) > T) \\ 0 & \text{if } (g(x,y) \leq T) \end{cases}$$

สมการที่ 3.6

โดย  $g(x,y)$  คือค่า Gray value ที่ตำแหน่ง  $(x,y)$  ใดๆ

$T$  คือค่า Thresholding ที่ใช้ในการทำ Image thresholding

ซึ่งในการใช้ Image Thresholding จะถูกใช้เพื่อระบุตำแหน่งของวัตถุที่มีความเข้มสูงกว่าจุดอื่น หรือก็คือตำแหน่งของ ELISpot

### 3.3.6 Dynamic thresholding

Dynamic thresholding เป็นกระบวนการเปรียบเทียบรูปภาพที่ถูกปรับให้เรียบด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น Mean Image, Binomial filter, Gauss filter และอื่นๆ เปรียบเทียบกับรูปตั้งต้นว่าส่วนไหนที่มีความต่างกันมาก กระบวนการนี้เปรียบเสมือน High pass filter ดังรูปที่ 3.26 ที่แยกขอบเส้นที่ต่างจากฉากหลังออกมาเพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ในขั้นถัดไป

โดยการคำนวณจะสามารถทำได้โดยเลือก Area ที่เข้าตามเงื่อนไขดังสมการที่ 3.7

$$g_0 \leq g_t - \text{offset}$$

สมการที่ 3.7

$g_0$  = ค่าความเข้มพิกเซลของรูปภาพตั้งต้น

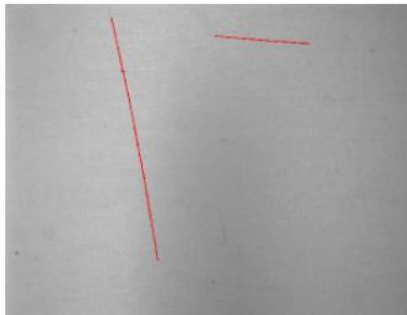
$g_t$  = ค่าความเข้มพิกเซลของรูปภาพที่ผ่านกระบวนการทำให้ภาพเรียบ



รูปที่ 3.26 (a) รูปต้นแบบ

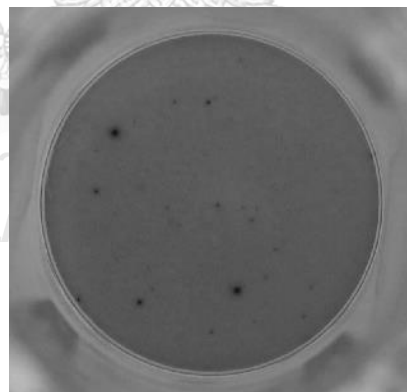


รูปที่ 3.26 (b) แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ Thresholding ปกติ

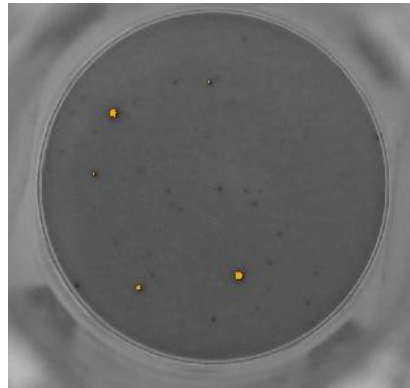


รูปที่ 3.27 (c) แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ Dynamic Thresholding

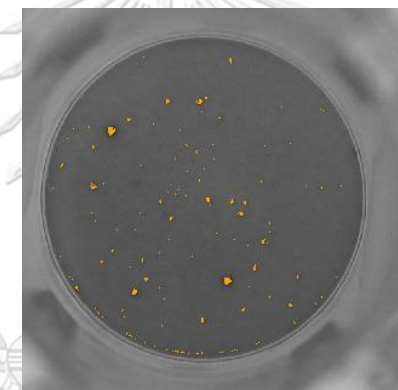
โดยเมื่อนำมาใช้งานกับรูปภาพของ Well plate จะได้ผลลัพธ์ดังรูปที่ 3.28



รูปที่ 3.28 (a) รูปต้นแบบของ Well Plate



รูปที่ 3.29 (b) แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ Thresholding ของ Well Plate

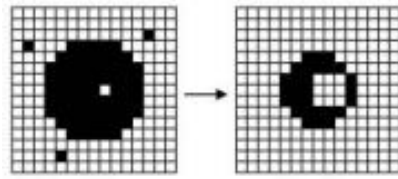


รูปที่ 3.30 (c) แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ Dynamic Thresholding ของ Well Plate

### 3.3.7 Morphology

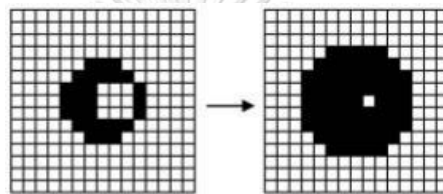
เนื่องจากเมื่อรูปภาพผ่านกระบวนการ Image thresholding อาจจะมีสิ่งเจือปนอยู่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ สันฐานวิทยาจึงจำเป็นในการจัดการกับข้อมูลเพื่อให้ได้สิ่งที่ต้องการ โดยการบวนการ Erosion มาช่วยโดยหลักการของ Erosion [23] นั่นคือ การย่อภาพเป็นลักษณะของการลบข้อมูลภาพบริเวณขอบของภาพ โดยจะลบออกเป็นขนาดตามที่ได้กำหนดไว้ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการลบ noise และรายละเอียดที่ไม่ต้องการของข้อมูลออกไป ซึ่งสามารถแสดงดังรูป 3.31





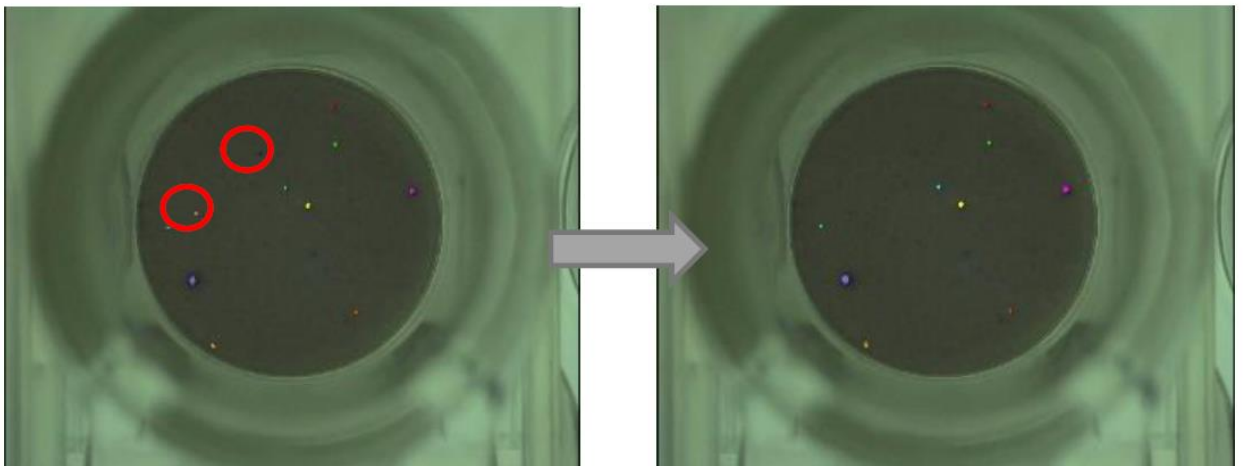
รูปที่ 3.31 แสดงการแปลงภาพด้วย Erosion [24]

ในการทำงานเดียวกันเมื่อรูปภาพผ่านกระบวนการ Erosion จะทำให้วัตถุที่สนใจมีขนาดเล็กลงได้เพื่อดึงข้อมูลกลับมาโดยไม่กระทบค่า Noise นั่นคือการทำ Progressive Dilation อีกครั้ง ซึ่งการทำกระบวนการ Dilation คือกระบวนการในการขยายภาพให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเป็นวิธีที่นิยมใช้ควบคู่กับ Erosion เพื่อชดเชยจุดของข้อมูลที่หายไป แสดงดังรูป 3.32



รูปที่ 3.292 แสดงการแปลงภาพด้วย Dilation [24]

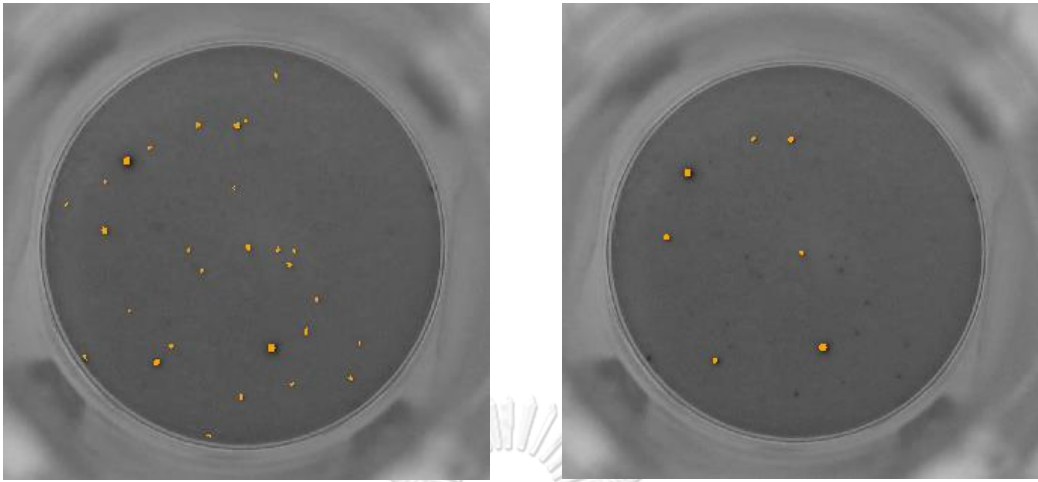
โดยเมื่อนำมาใช้งานกับรูปภาพของ Well plate จัดการข้อมูลจำพวก noise และ ฝุ่นออกด้วยกระบวนการ Morphology จะได้ผลลัพธ์ดังรูปที่ 3.33



รูปที่ 3.303 แสดงการจัดการข้อมูลจำพวก noise และ ฝุ่นออกด้วยกระบวนการ Morphology

### 3.3.8 Area filter

หลังจากผ่านกระบวนการแยกข้อมูลภาพและกระบวนการสัญญาณวิทยา เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถปรับเพื่อเลือกขนาดของจุดที่ต้องการนับ การใช้ Area Filter ดังภาพที่ 3.34



รูปที่ 3.314 ตัวอย่างก่อนและหลังทำการจัดการข้อมูลด้วย Area filter



## บทที่ 4 วิธีการทดสอบ และผลการทดสอบ

### การทดสอบ Repeatability ของเครื่องจักร

#### วิธีการทดสอบ

การทดสอบ Repeatability ระบบที่ถูกสั่งการให้ทำงานในลักษณะการเคลื่อนที่และทำการเก็บภาพของ Well plate แบบเดิม และทำการเปรียบเทียบ Displacement ที่เกิดขึ้นในการเริ่มต้นทำโปรแกรมใหม่แต่ละรอบ โดยจะทำการทดสอบ โดยเทียบตำแหน่งอ้างอิงเทียบกับตำแหน่งบน Well plate ก่อนที่จะผ่านกระบวนการ Alignment

#### ผลการทดสอบ

จากการทดสอบวัดค่า Repeatability ของเครื่องจักรพบว่าการปรับปรุงลักษณะจากการยึดชิ้นงานด้วยดินน้ำมันเป็น Stage clip สามารถช่วยลดค่า Error ของการจัดวางชิ้นงาน โดยตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Displacement

โดยเมื่อสอบถามการใช้งานของผู้ทำการทดสอบพบว่าการยึดจับชิ้นงานด้วย Stage clip สามารถควบคุมแรงที่กดทับลงบน Well plate ได้คงที่เมื่อเทียบกับการกดชิ้นงานด้วยดินน้ำมัน ซึ่งไม่สามารถกำหนดแรงที่กดลงบน Well plate ได้

ตารางที่ 4.1 Error ของการจัดวางชิ้นงานเทียบการยึดด้วยดินน้ำมันและ Stage clip

Value	ยึดชิ้นงานด้วยดินน้ำมัน		ยึดชิ้นงานด้วย Stage clip	
	Displacement of Row (mm)	Displacement of Column (mm)	Displacement of Row (mm)	Displacement of Row (mm)
ค่าเฉลี่ย	0.369996	0.10689	0.095428	0.049855
ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.296257	0.065568	0.087556	0.063352

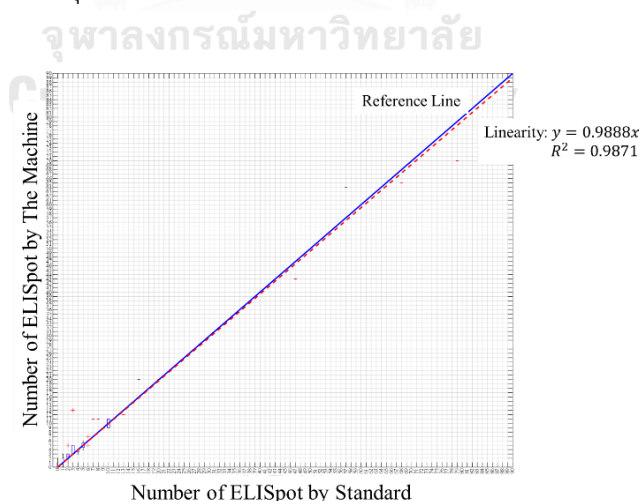
## การทดสอบวัดผลความสามารถของการวิเคราะห์ผลการนับด้วยรูปภาพ

### วิธีการทดสอบ

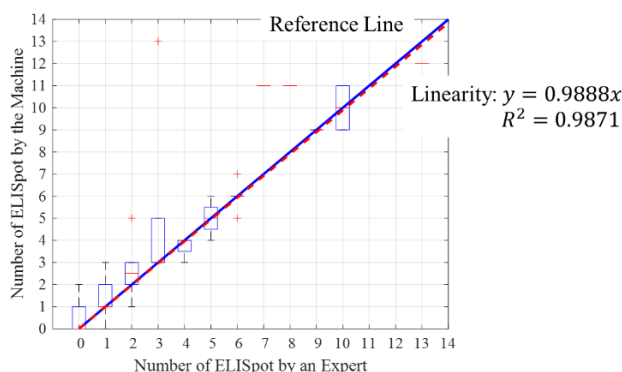
ตัวอย่าง well plate ทั้ง 72 well plate ถูกจัดเตรียมโดย Biomed Diagnostics (Thailand) Co.,LTD. โดยมีข้อมูลจำนวน ELISpot อยู่ในช่วง 0- 90 จุดเพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของการตรวจสอบโดยข้อมูลตัวอย่างได้ถูกเก็บข้อมูลกับโดยเครื่องวินัยที่เป็นที่ยอมรับ ImmunoSpot CLT Analyzers ที่ถูกพัฒนาโดย Cellular Technology Limited (CTL) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ เครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้น

### ผลการทดสอบ

จากรูปที่ 4.1 แสดงการพลอตของกราฟจำนวน ELISpot ที่ผ่านการนับจากเครื่อง ImmunoSpot CLT Analyzers เปรียบเทียบกับเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้น โดยแกน X แสดงถึงจำนวนของ Spot ทำการวิเคราะห์ภาพจาก CLT Analyzer และ แกน Y แสดงถึงจำนวนของ Spot ที่ทำการวิเคราะห์ผ่านเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้น จุดสีแดงได้แสดงถึงข้อมูลของจำนวน ELISpot ที่ได้นับจากเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้น ส่วนเส้นสีฟ้าแสดงถึงจำนวนอ้างอิงของ ELISpot โดยมีค่าความชันอยู่ที่ 1 ดังเส้นประสีฟ้าที่ Goodness of fitness  $R^2 = 0.9871$  โดยเมื่อทำการพิจารณาหาเส้นอ้างอิงกำกับของข้อมูลการนับ ELISpot จากเครื่องที่ถูกพัฒนา สามารถแสดงได้ตามเส้นประสีแดง โดยสามารถพิจารณาหาสมการของเส้นอ้างอิงกำกับ และจากรูปที่ 4.2 แสดง Boxplot และ เส้นอ้างอิงกำกับในช่วงที่มี ELISpot อยู่ระหว่าง 0- 14 จุด



รูปที่ 4.1 Boxplot in range 0 to 90 spots



รูปที่ 4.2 Boxplot in range 0 to 14 spots

$$Y = 0.9888 \times X \quad (1a)$$

Goodness of fitness.

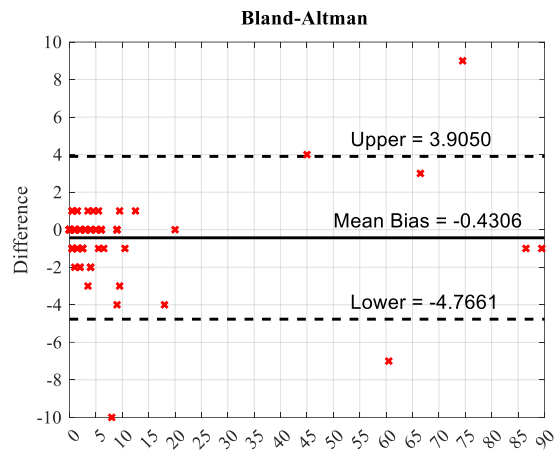
$$R^2 = 0.9871 \quad (1b)$$

*Pearson's coefficient*

Pearson's coefficient [25] เป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่ถูกใช้ในการพิจารณาความถูกต้องของการทำงานของเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับเครื่องมาตรฐาน โดยค่า Pearson's coefficient,  $r$  คำนวณที่  $p$ -value = 0.994 ที่ค่า โคนได้น้อยกว่า 0.0001 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงเป็นค่าที่ยอมรับได้

*Bland-Altman*

Bland-Altman ถูก [26] เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมถูกนำมาวัดความสามารถของเครื่องที่พัฒนาขึ้น โดยค่า Bland-Altman คำนวณได้จากการนับผลต่างของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้นกับเครื่องที่เป็นที่ยอมรับ CTL Machine จะต้องอยู่ในช่วง  $\pm 2SD$  ของค่าเฉลี่ยผลต่างทั้งสอง โดยรูปที่ 4.3 ได้แสดงการพลอตกราฟ Bland-Altman แสดงให้เห็นว่าจะมีจำนวนข้อมูล 95.7 percentage ที่อยู่ในช่วงค่าความต่าง 2 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงได้ว่าเครื่องเหมาะสมกับการนำมาใช้ในการตรวจนับ ELISpot ที่อยู่ในกรอบจำนวน 0 – 90 จุด



รูปที่ 4.3 Bland Altman plot of developed platform

### Performance of the platform

ทางผู้พัฒนาได้ออกแบบเกณฑ์ในการทดสอบความสามารถของเครื่องที่พัฒนาขึ้นโดยได้ระบุไว้ว่า ค่าความต่างของผลลัพธ์เครื่องที่พัฒนากับผลลัพธ์ที่ได้จากเครื่องมาตรฐานนั้นต้องมีค่าน้อยกว่า round upper ของ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ผลลัพธ์ที่ได้จากเครื่อง CTL machine ซึ่งผลลัพธ์ได้ค่า ข้อมูลที่ได้ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดอยู่ที่ 80.5 เปอร์เซ็นต์ของข้อมูล

## บทที่ 5 สรุปผล

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาโปรแกรมสำหรับควบคุมสั่งการระบบอัตโนมัติสำหรับเก็บข้อมูล 96 well plate assay และพัฒนาการนับจุดสำหรับวิเคราะห์ ELISpot ให้สามารถใช้งานได้ภายในห้องทำงานทดลองโดยสามารถภาระการทำงานของผู้ใช้งาน

ในการออกแบบระบบเพื่อให้สามารถดูแลรักษาและพัฒนาต่อขยายได้ง่าย Desk Top robot ของ IA1 รุ่น Table Top ได้ถูกเลือกใช้ในโปรเจกต์นี้ใช้งานควบคู่กับกล้อง Dino-lite digital microscope Premier ที่อยู่ที่ตำแหน่ง End effector ของ Robot และยึดจับชิ้นงานด้วย Forceps gripper

การสั่งงานของ Robot สั่งผ่านโปรแกรมที่ทางผู้พัฒนาได้พัฒนาขึ้นผ่าน C# window form application โดยเมื่อทำการทดสอบผู้ใช้งานสามารถใช้งานได้ดีและสามารถนำรูปภาพไปใช้ในงานอื่นๆได้และให้ข้อเสนอแนะเพื่อให้โปรแกรมมีการโต้ตอบกับ User ได้มากขึ้น เช่น หน้าต่างในการบันทึก Model ของ Well Plate ที่เมื่อกดบันทึกแล้ว โปรแกรมไม่มีข้อความแจ้งเตือนว่าบันทึกแล้วทำให้ผู้ใช้งานเข้าใจว่าอาจจะทำการ calibrate model ผิด นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะเรื่อง Flow การทำงานให้สามารถเข้าสู่หน้าเมนูก่อนที่จะเลือกโหมดเก็บภาพหรือทำการวิเคราะห์ภาพ

โดยทดสอบต่อมาคือการทดสอบค่า Repeatability ของหุ่นยนต์ที่ใช้งานควบคู่กับกล้อง โดยได้ทำการทดสอบเคลื่อนที่กล้องไปที่ตำแหน่งต่างๆและวัดจุดศูนย์กลางของหลุมแต่ละหลุมว่ามีค่าต่างกันแต่ละครั้งเป็นค่าเท่าไร จากการทดสอบสรุปได้ว่า การหนีบจับด้วย Stage Clip สามารถให้ค่า Repeatability ที่มีค่า Error เฉลี่ยจากตำแหน่งอ้างอิงอยู่ที่ 0.095428 mm ซึ่งระบบวิเคราะห์ด้วยรูปภาพสามารถทำการวิเคราะห์เพื่ออ้างอิงตำแหน่งของ Well plate ได้

การทดสอบต่อมาคือการทดสอบความสามารถของโปรแกรมตรวจวัดพบว่าผลลัพธ์จากภาพ Well Plate ทั้ง 72 หลุมที่มีจุดในช่วง 0 ถึง 90 แสดงให้เห็นว่าผลลัพธ์ที่ยอมรับของเครื่องนับ ELISpot อยู่ที่นี้คือ 80.5 เปอร์เซ็นต์ ข้อผิดพลาดอาจมาจากฝุ่น ข้อจำกัดของความละเอียด และจุดของข้อมูลที่อยู่ชิดติดกัน

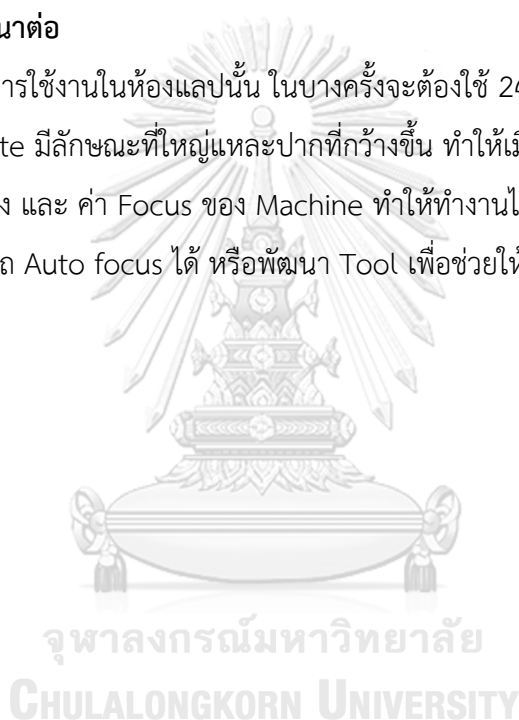
ข้อเสนอแนะจากการพัฒนาหน้าต่างโปรแกรมพบว่า การพัฒนาหน้าค่างของโปรแกรมให้มีความเสถียร ผู้ทำการพัฒนาควรมีความระวังเรื่องการเพิ่มขึ้นของ Memory ในกรณีที่ไม่ได้มีการจัดการกับข้อมูลของโปรแกรมที่ไม่ได้ใช้แล้ว นอกจากนี้ การพัฒนาโปรแกรมให้สามารถทำงานได้เร็ว

และไม่เกิดอาการค้างเวลาใช้งาน การพัฒนาควรแบ่ง Thread ของโปรแกรมเพื่อกระจายหน้าที่การทำงานให้โปรแกรมทำงานหลายงานได้ในเวลาเดียวกัน

ข้อเสนอแนะในการจัดเตรียมในส่วนการเก็บข้อมูลภาพพบว่า การเก็บข้อมูลภาพนั้น ผู้ทำการทดสอบควรคำนึงผลจากแสงภายนอกที่ไม่เสถียรเช่น การจัด backlight ไม่อยู่ตรงกลางของ object ซึ่งอาจจะทำให้ภาพที่ได้จากข้อมูลในการถ่ายรอบเดียวกันมีค่าแสงฉากหลังที่ต่างกัน เพราะแสงที่ขอบของ backlight ให้แสงที่สว่างน้อยกว่าแสงบริเวณตรงกลาง นอกจากนี้ ในส่วนของการพัฒนาโปรแกรมวิเคราะห์ภาพนั้น

#### แนวทางและการพัฒนาต่อ

เนื่องด้วยในการใช้งานในห้องแลปนั้น ในบางครั้งจะต้องใช้ 24 Well plate มาใช้งานในการทดสอบ ซึ่ง Well plate มีลักษณะที่ใหญ่และปากที่กว้างขึ้น ทำให้เมื่อต้องใช้งาน ผู้ใช้งานต้องมีการปรับความสูงของเครื่อง และ ค่า Focus ของ Machine ทำให้ทำงานได้ไม่สะดวก จึงอาจจะทำการพัฒนาระบบให้สามารถ Auto focus ได้ หรือพัฒนา Tool เพื่อช่วยให้ผู้ใช้งานสามารถปรับ Focus ของกล้องได้ง่ายขึ้น







## ผลการนับ

Well's Number	Result	Validate data	absolute Error
7	0	0	0
11	0	0	0
12	1	0	1
24	0	0	0
34	1	0	1
61	2	0	2
67	0	0	0
68	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
78	0	0	0
84	1	0	1
87	1	0	1
91	0	0	0
94	0	0	0
3	1	1	0
21	2	1	1
22	1	1	0
35	1	1	0
36	3	1	2
75	0	1	1
80	2	1	1
83	1	1	0
85	1	1	0
86	1	1	0
93	3	1	2
96	0	1	1
2	2	2	0
9	2	2	0
10	2	2	0
17	3	2	1
76	5	2	3
90	3	2	1
92	1	2	1
95	3	2	1
23	3	3	0
63	5	3	2
66	13	3	10
69	3	3	0

Well's Number	Result	Validate data	absolute Error
71	3	3	0
74	5	3	2
82	3	3	0
4	4	4	0
29	4	4	0
33	3	4	1
70	4	4	0
26	5	5	0
27	5	5	0
28	4	5	1
62	6	5	1
5	5	6	1
6	6	6	0
8	6	6	0
14	6	6	0
15	6	6	0
16	7	6	1
25	11	7	4
64	11	8	3
1	9	9	0
19	9	9	0
81	9	9	0
79	9	10	1
88	11	10	1
31	12	13	1
89	20	16	4
13	20	20	0
65	43	47	4
77	64	57	7
18	65	68	3
30	70	79	9
20	87	86	1
32	90	89	1

## Repeat \_ Stage Clip

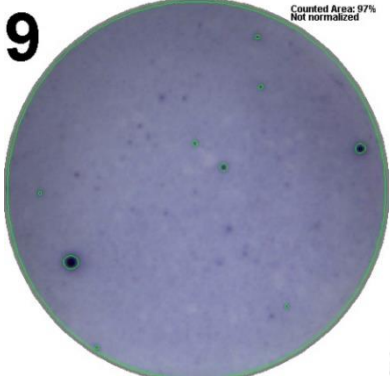
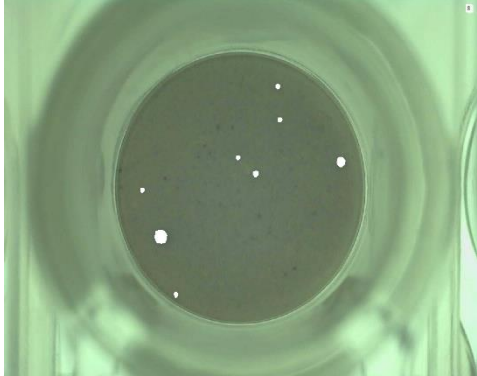
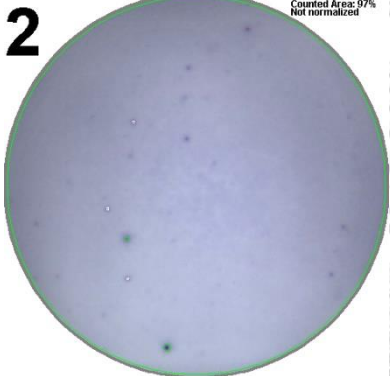

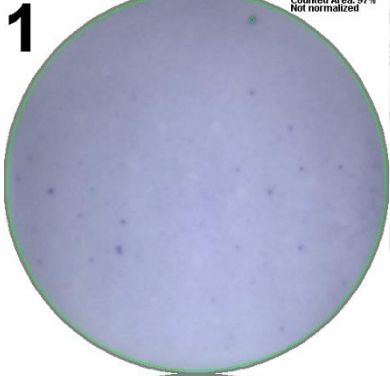

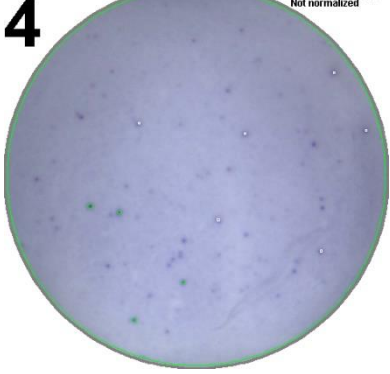

R1-R3	C1-C3	R2-R3	C2-C3	R1-R3	C1-C3	R2-R3	C2-C3
0.15381	0.086137	0.143934	0.08401	0.043258	0.032733	0.120598	0.030417
0.149966	0.094325	0.129066	0.076201	0.102154	0.046434	0.15416	0.038275
0.187782	0.122904	0.117282	0.102184	0.034621	0.032134	0.076471	0.028859
0.285143	0.132121	0.044367	0.107656	0.056449	0.037307	0.034031	0.011593
0.270793	0.125381	0.044187	0.104211	0.025054	0.037327	0.057847	0.029967
0.371709	0.13295	0.032364	0.103892	0.050218	0.043238	0.06276	0.03503
0.472116	0.166163	0.059235	0.141108	0.070359	0.046953	0.005053	0.044506
0.813698	0.381026	0.483649	0.398091	0.059126	0.020251	0.186613	0.011464
0.148009	0.076001	0.140999	0.08381	0.026702	0.025893	0.074474	0.015478
0.201382	0.075203	0.085947	0.085258	0.031475	0.016267	0.038165	0.014549
0.179184	0.081843	0.143615	0.020331	0.017495	0.018274	0.040932	0.010565
0.174491	0.085797	0.232298	0.046284	0.055641	0.009337	0.028409	0.010884
0.165254	0.079826	0.179673	0.080874	0.012223	0.007789	0.044696	0.017295
0.275936	0.066165	0.067893	0.058626	0.073984	0.012592	0.009556	0.004923
0.287869	0.067374	0.036148	0.080255	0.0557	0.035609	0.040742	0.019822
0.011663	0.023197	0.058347	0.037117	0.010046	0.022817	0.163447	0.017026
0.061233	0.037297	0.16781	0.053903	0.054772	0.036718	0.147489	0.002766
0.073495	0.0347	0.154939	0.060184	0.001847	0.046174	0.187522	0.038695
0.088563	0.026702	0.164006	0.04193	0.079227	0.00702	0.078588	0.014419
0.018254	0.038275	0.087455	0.059365	0.04884	0.002546	0.013561	0.003165
0.006361	0.021369	0.050937	0.025973	0.028789	0.020561	0.004933	0.012692
0.001248	0.037297	0.005193	0.045305	0.077799	0.02116	0.017585	0.010944
0.103662	0.018593	0.086716	0.033612	0.099757	0.017116	0.00676	0.018733
0.051067	0.091749	0.009546	0.041591	0.127837	0.036358	0.028589	0.008827
0.039573	0.017026	0.025723	0.039234	0.120198	0.008248	0.088374	0.001468
0.011384	0.005902	0.032713	0.023776	0.101615	0.015158	0.11208	0.001368
0.077849	0.016956	0.032683	0.03527	0.012153	0.018054	0.044037	0.005422
0.100117	0.025184	0.090161	0.052485	0.059106	0.009786	0.050767	0.007739
0.042479	0.032993	0.138053	0.054872	0.098419	0.011034	0.107516	0.008757
0.061412	0.016127	0.122315	0.064628	0.04875	0.023546	0.047532	0.009556
0.011174	0.04217	0.174421	0.064488	0.008588	0.009297	0.015368	0.014979
0.02822	0.038725	0.201223	0.065287	0.039454	0.009766	0.060663	0.07695
0.110922	0.064608	0.079197	0.061632	0.052655	0.003385	0.050777	0.031036
0.09803	0.060214	0.0697	0.060394	0.042379	0.009546	0.122275	0.042429
0.073006	0.051107	0.064178	0.057068	0.017635	0.003096	0.045096	0.028749
0.045155	0.098839	0.095703	0.090441	0.014939	0.008917	0.072926	0.043158
0.001019	0.093596	0.012382	0.060993	0.027391	0.015887	0.200064	0.005842
0.017635	0.052974	0.008508	0.048361	0.111151	0.026272	0.186633	0.010165
0.040452	0.061912	0.042859	0.030906	0.089243	0.000669	0.076221	0.024685

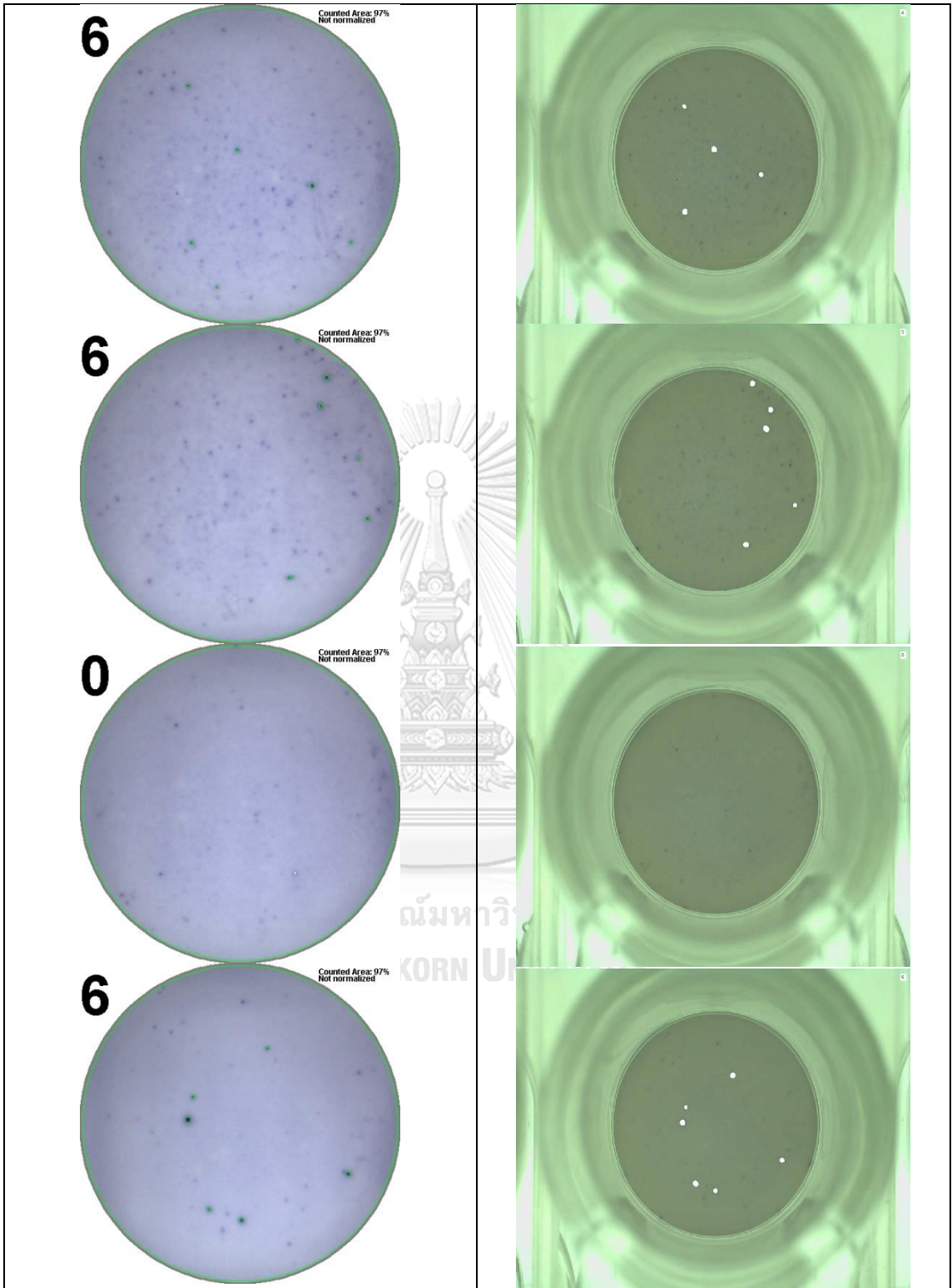
R1-R3	C1-C3	R2-R3	C2-C3	R1-R3	C1-C3	R2-R3	C2-C3
6.99E-05	0.037516	0.00668	0.048071	0.043258	0.000469	0.033083	0.010175
0.039863	0.062161	0.02134	0.110902	0.040053	0.005352	0.037067	0.055011
0.063719	0.043977	0.032364	0.074693	0.000459	0.001448	0.146491	0.001668
0.116344	0.016077	0.094485	0.002207	0.046534	0.007439	0.120767	0.010006
0.068922	0.000389	0.106268	0.008827	0.046534	0.032733		

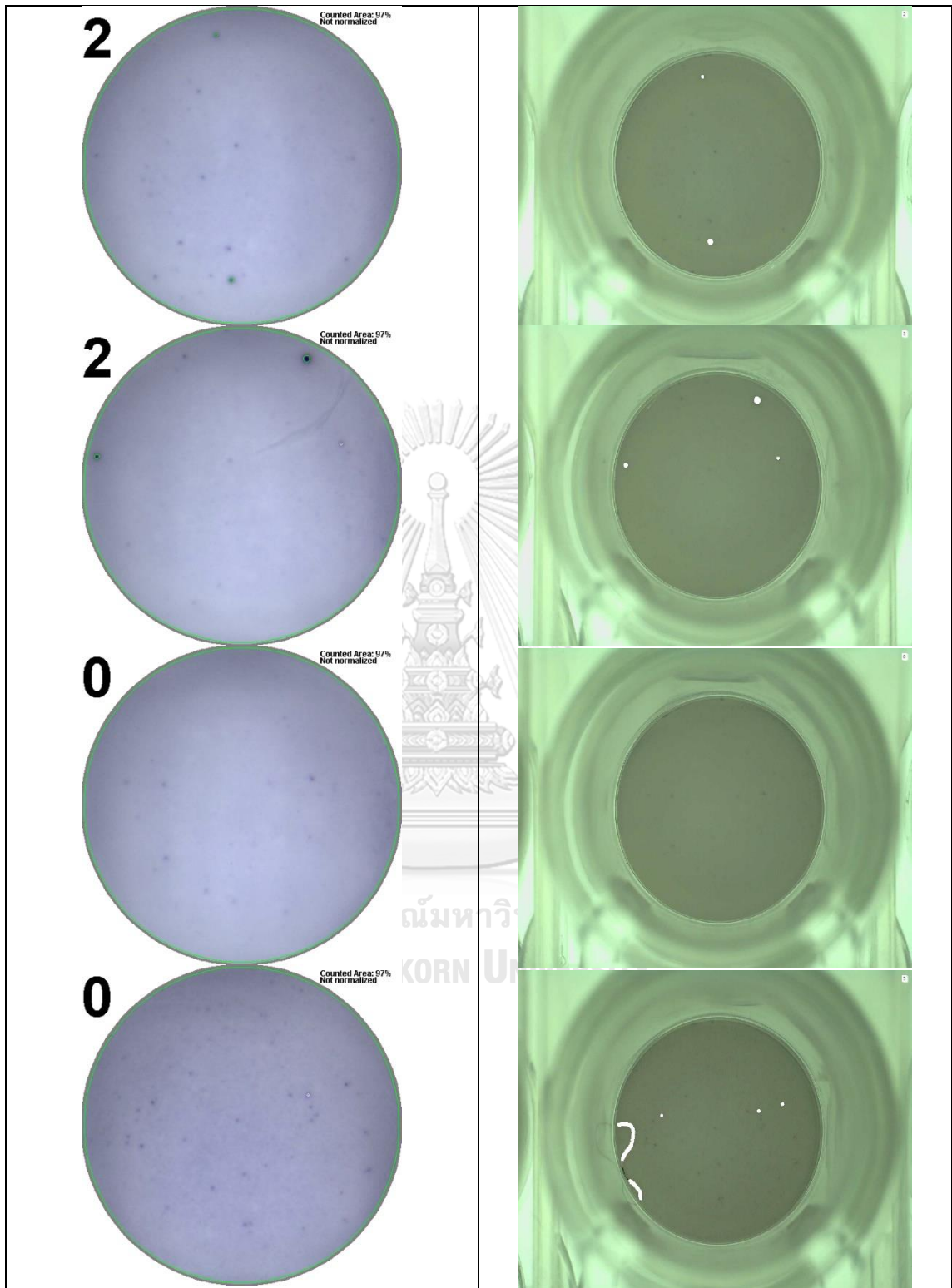
Repeat \_ ดินน้ำมัน

R1-R3	C1-C3	R1-R3	C1-C3	R1-R3	C1-C3	R1-R3	C1-C3
0.410913	0.005692	0.036348	0.032454	0.086976	0.683424	0.112939	0.060114
0.830913	0.51107	0.467432	0.442368	0.37127	1.63087	0.188131	0.227175
1.195892	2.509615	1.066177	0.454551	0.625506	1.462111	0.493695	1.49107
0.268017	1.438046	0.135606	1.131883	0.212596	1.426862	0.800756	1.012154
0.159073	1.799729	0.095464	0.463738	0.14719	1.677404	0.082083	1.199786
0.349201	1.58174	0.204608	1.242725	0.038545	0.569686	0.61572	0.094066
0.050728	1.925849	0.172653	0.69331	0.171555	1.411883	0.557703	0.618217
0.208802	1.479087	0.233466	1.130285	0.586662	0.071897	0.029458	0.545021
0.05592	1.333795	0.125121	0.889829	0.256134	1.776762	0.299572	0.031056
0.543923	1.474593	0.544123	2.240499	0.168959	1.495563	0.265321	0.844394
0.506576	1.863638	0.7001	0.708787	0.648773	2.197161	0.177147	0.844294
0.882539	1.187903	0.583167	0.489001	0.728759	0.969315	0.331127	0.411312
0.394137	0.387546	0.205007	0.321041	0.286491	0.274608	0.587561	0.034251
1.57495	0.951141	0.09816	0.157974	0.460742	2.365621	0.307061	0.135007
1.097133	2.783723	0.379458	1.140271	0.698103	1.391113	0.507575	1.326205

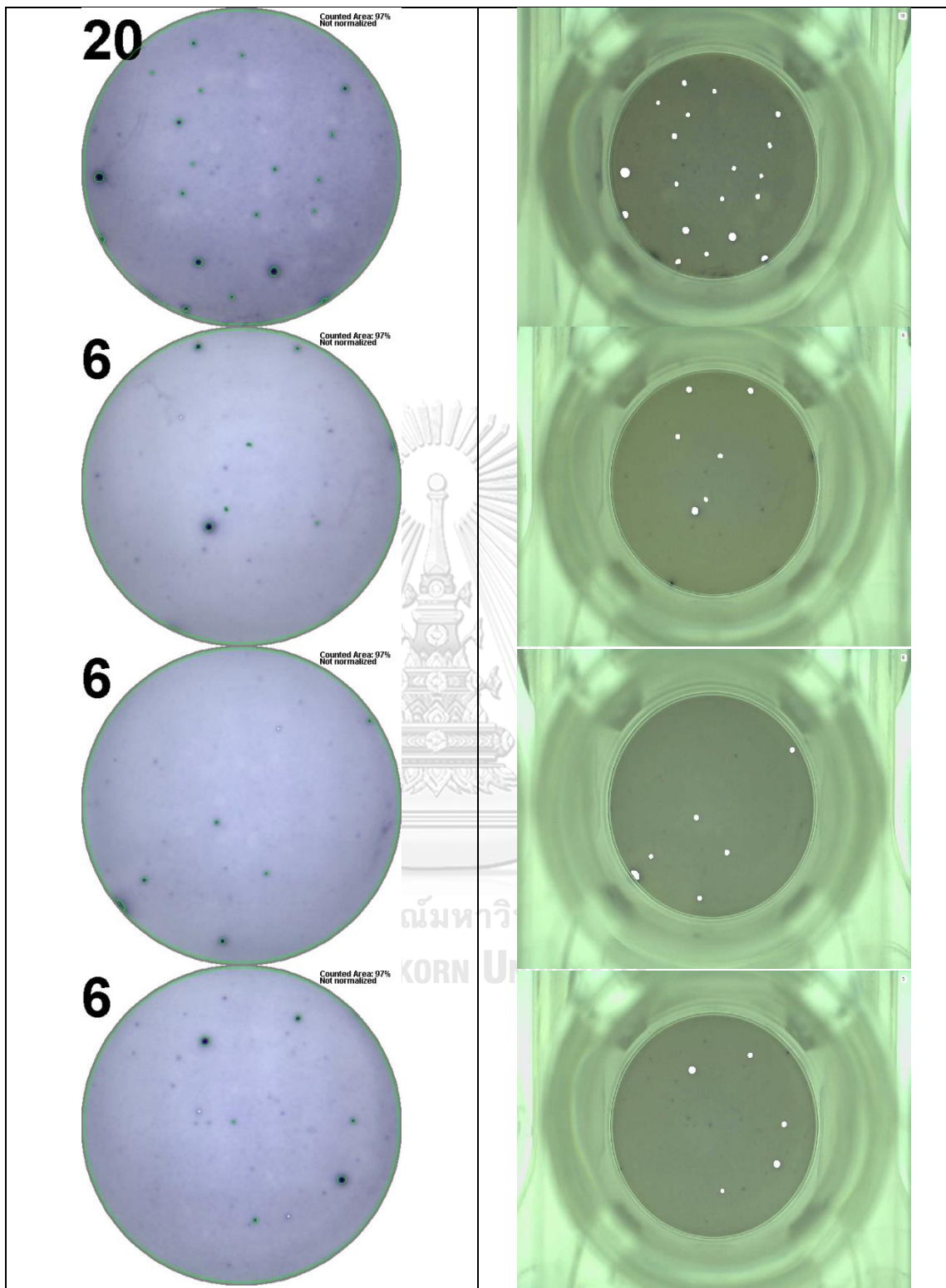
รูปภาพการถ่าย

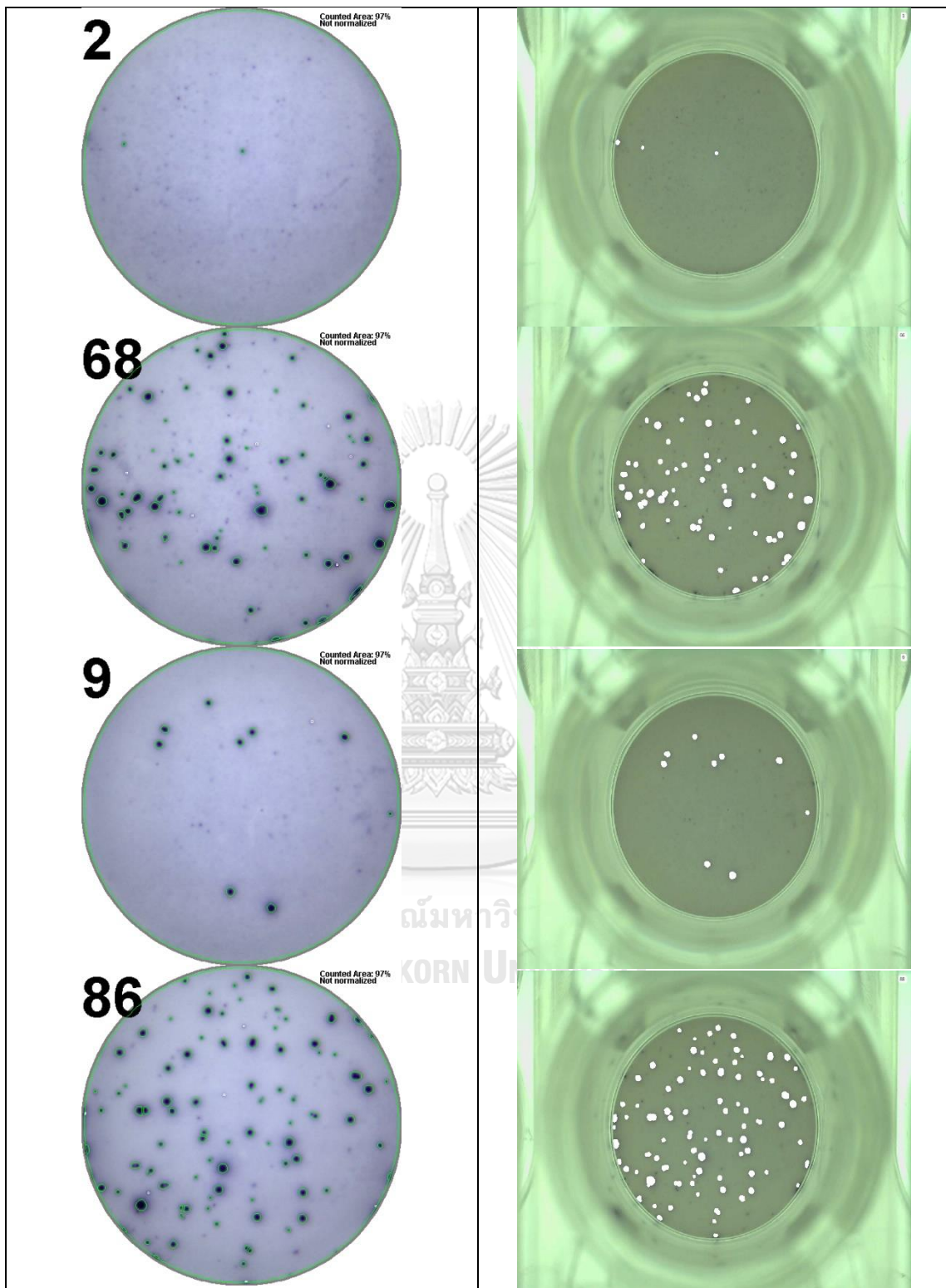
รูปภาพการถ่ายจาก CTL Machine	รูปภาพการถ่ายจากเครื่องที่ถูกพัฒนาขึ้น
<p><b>9</b></p> 	
<p><b>2</b></p> 	
<p><b>1</b></p> 	
<p><b>4</b></p> 	

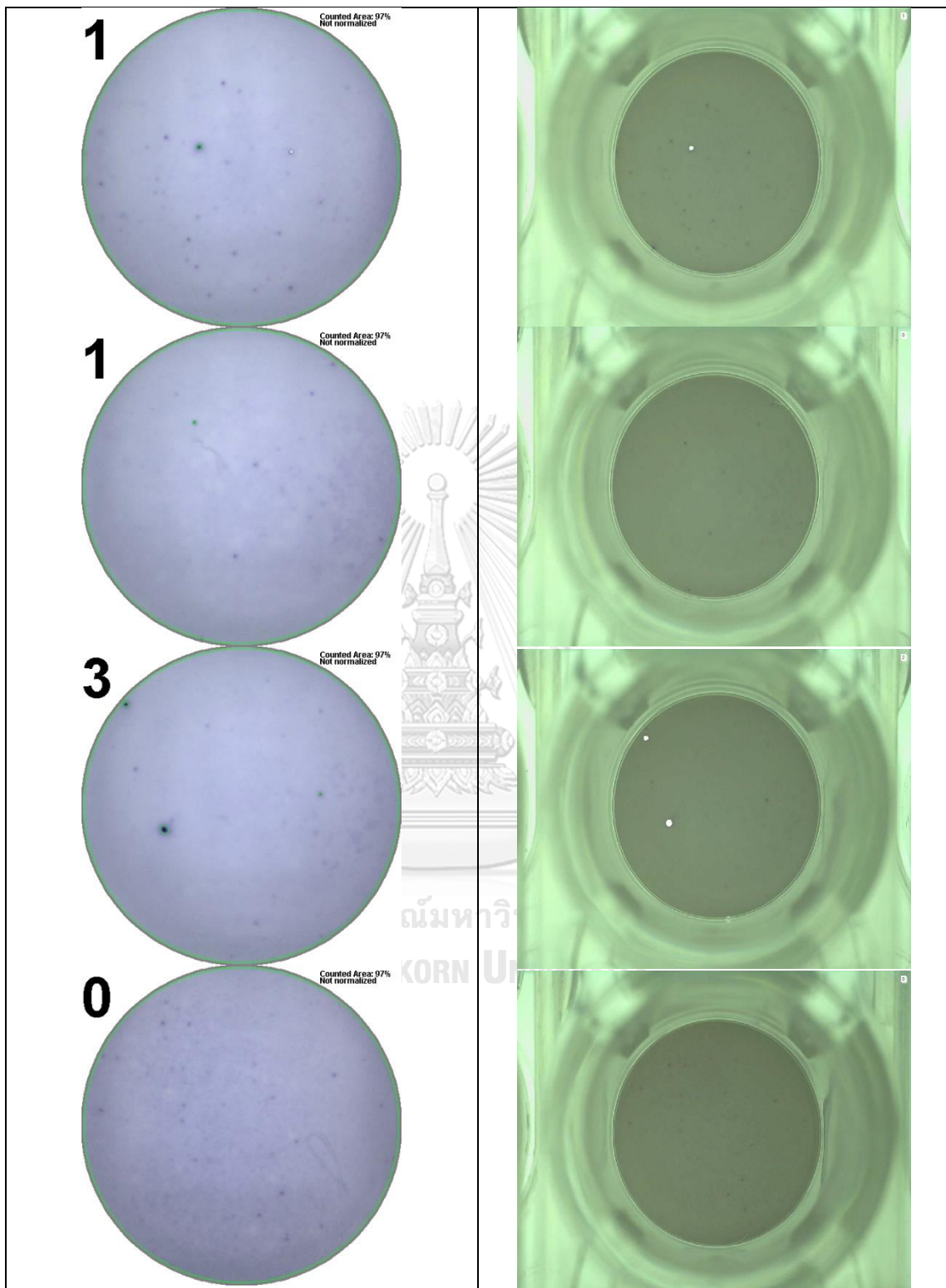


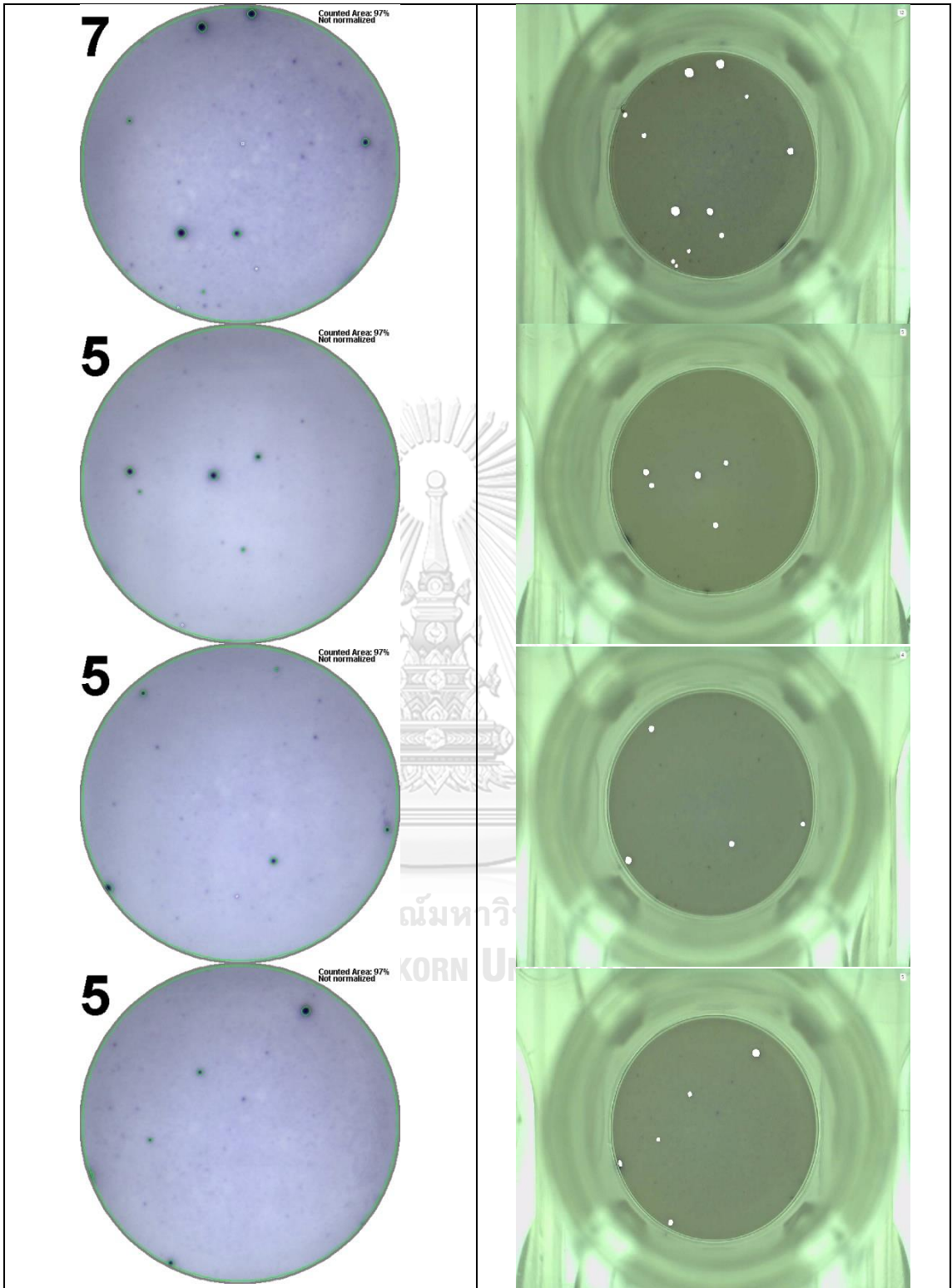


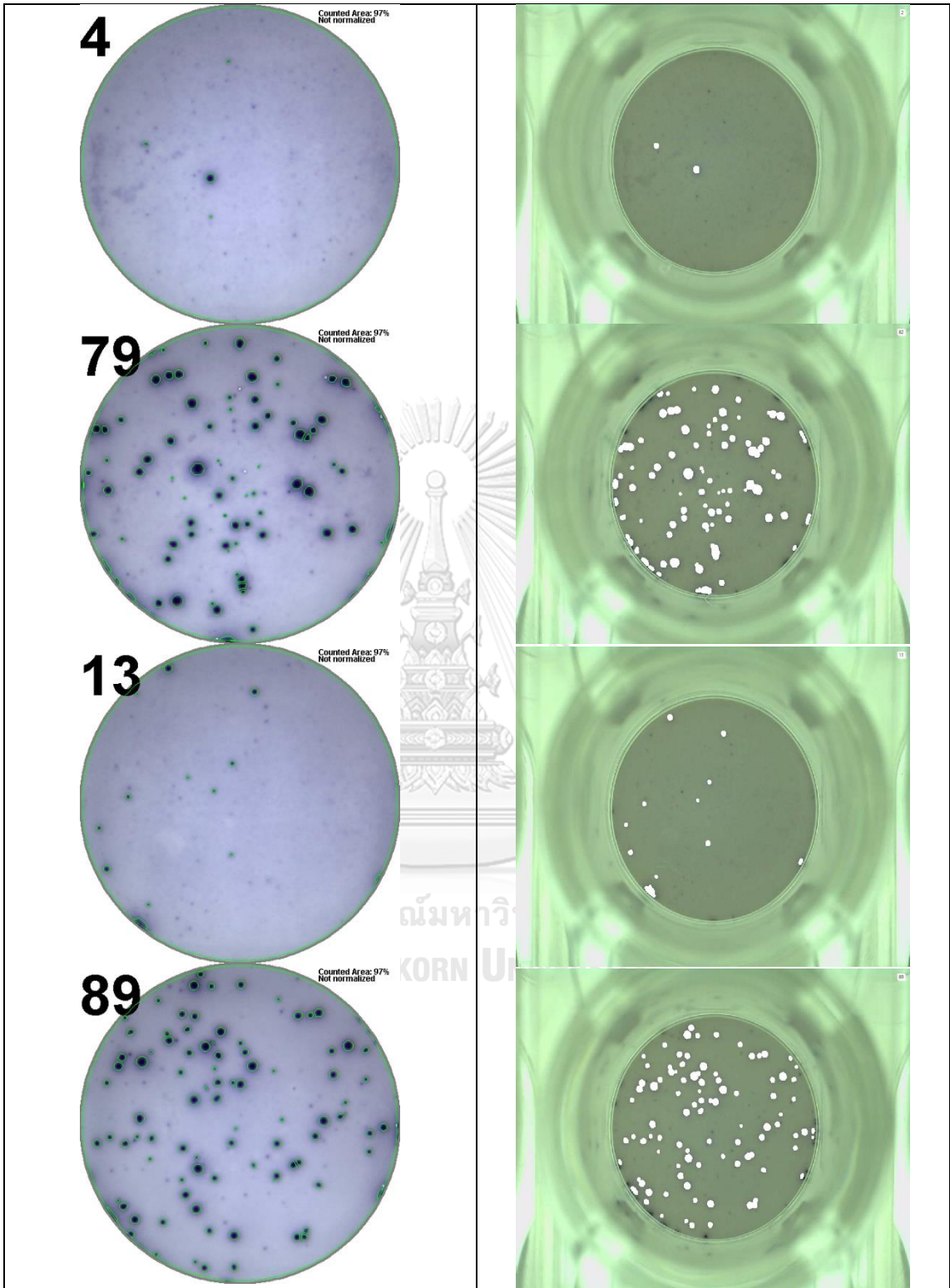


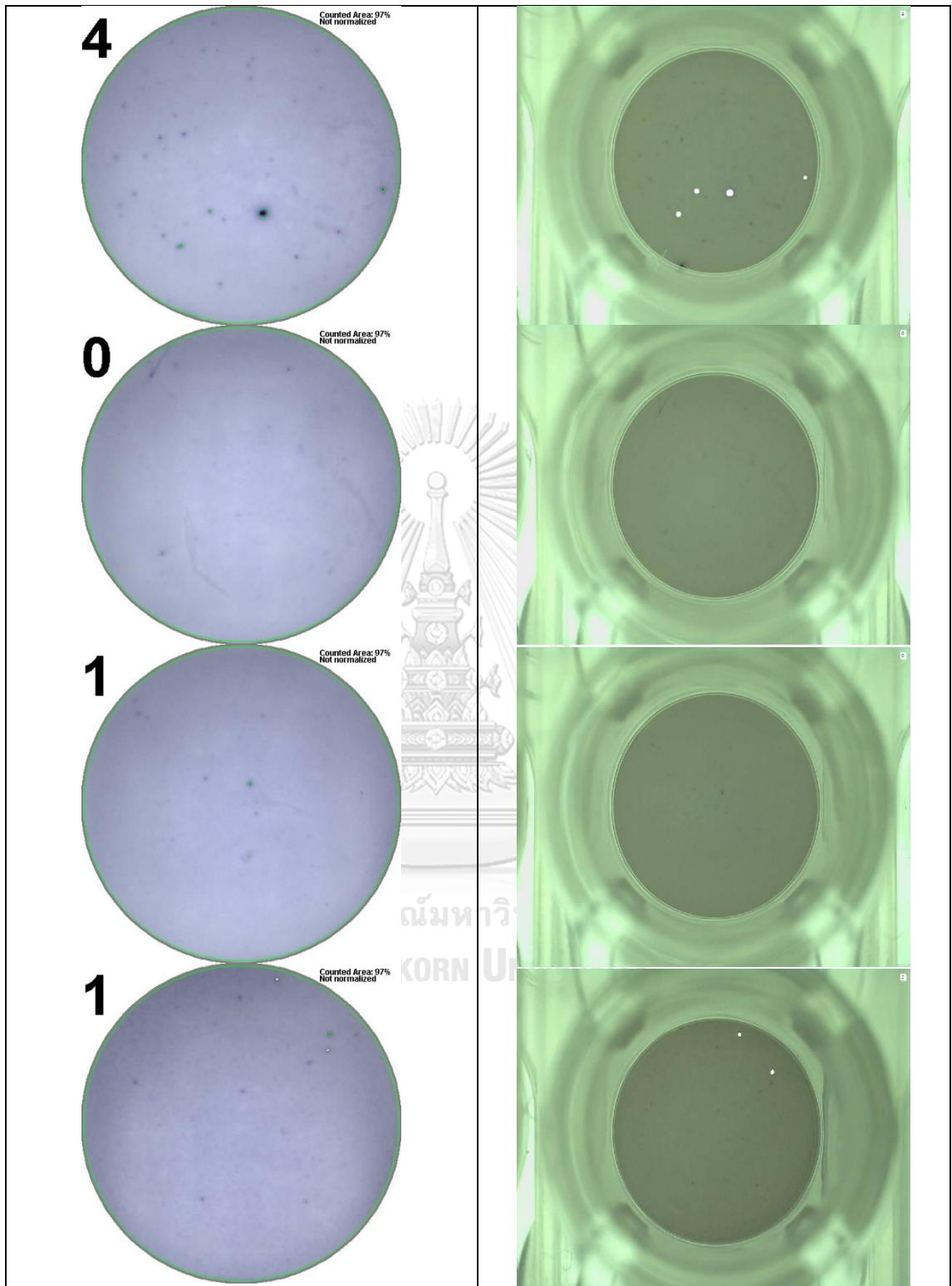


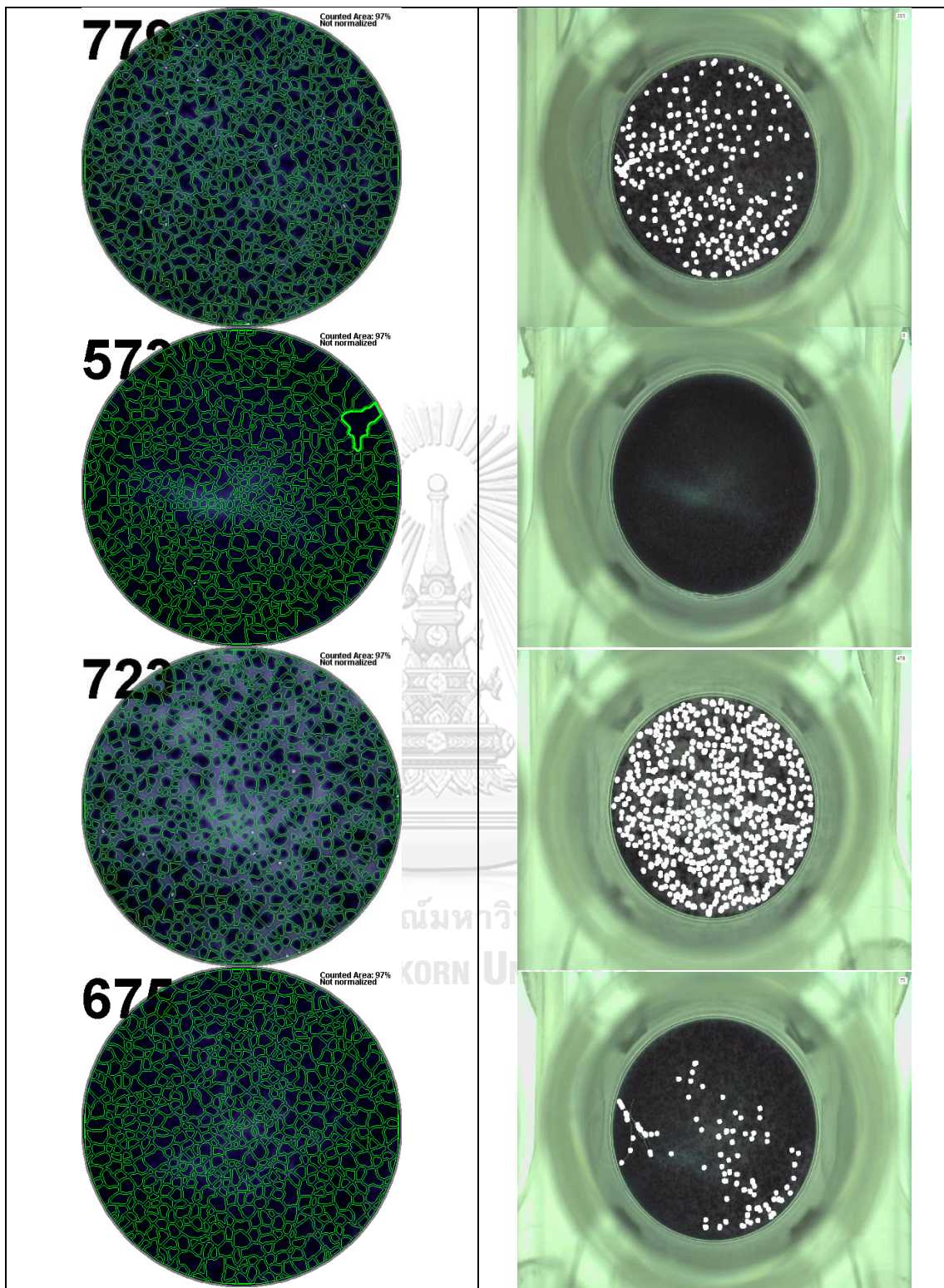


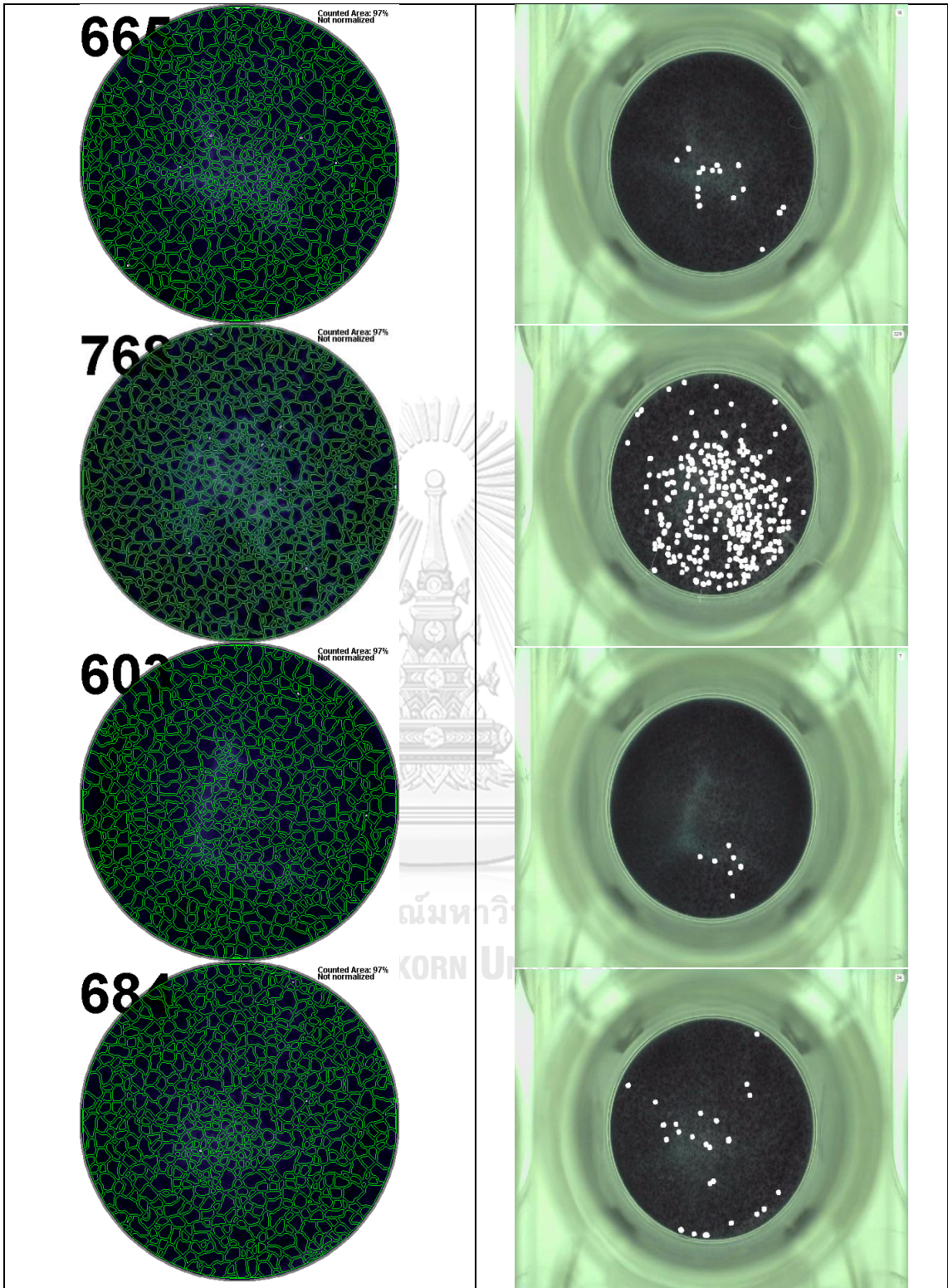




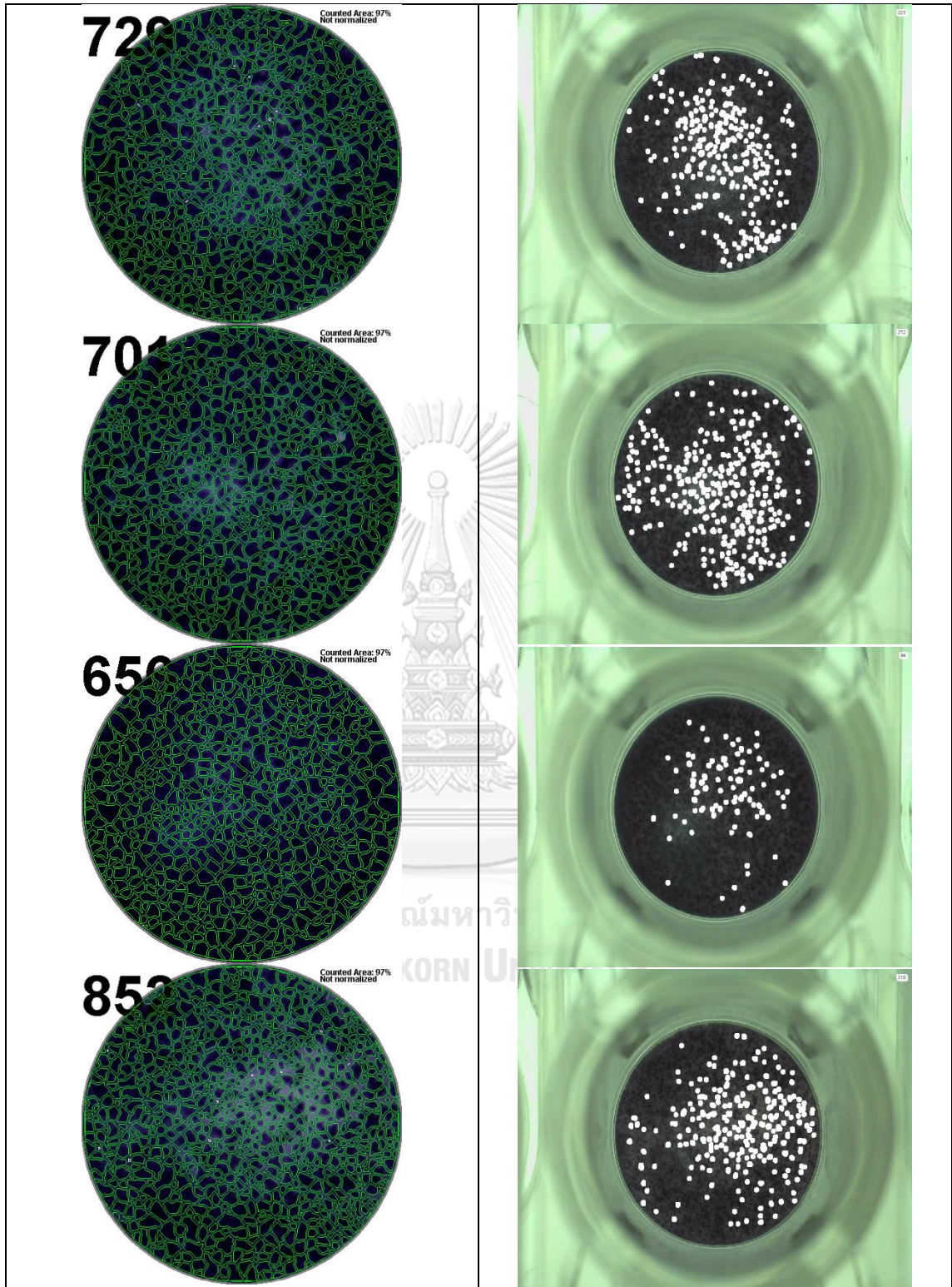


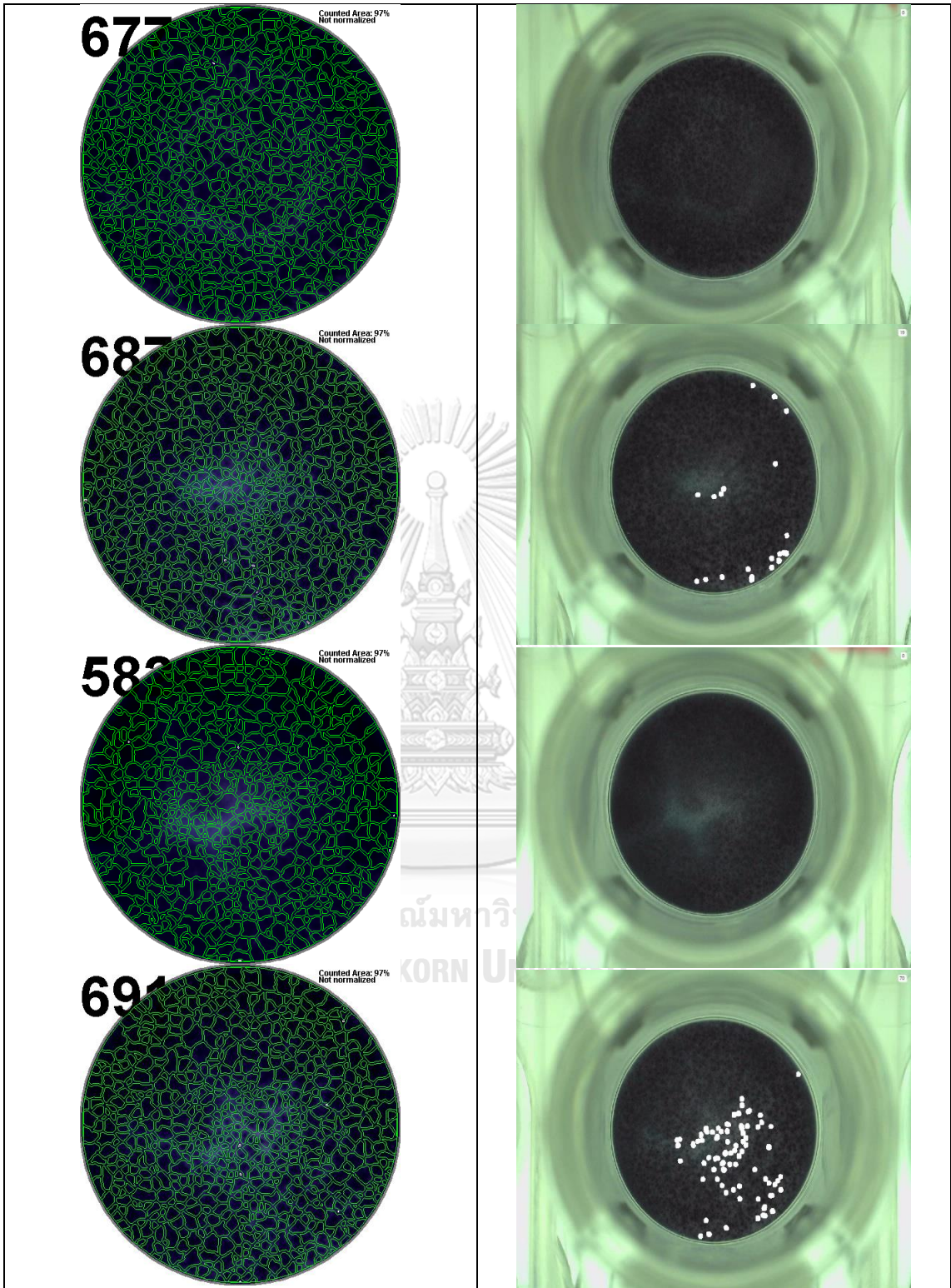


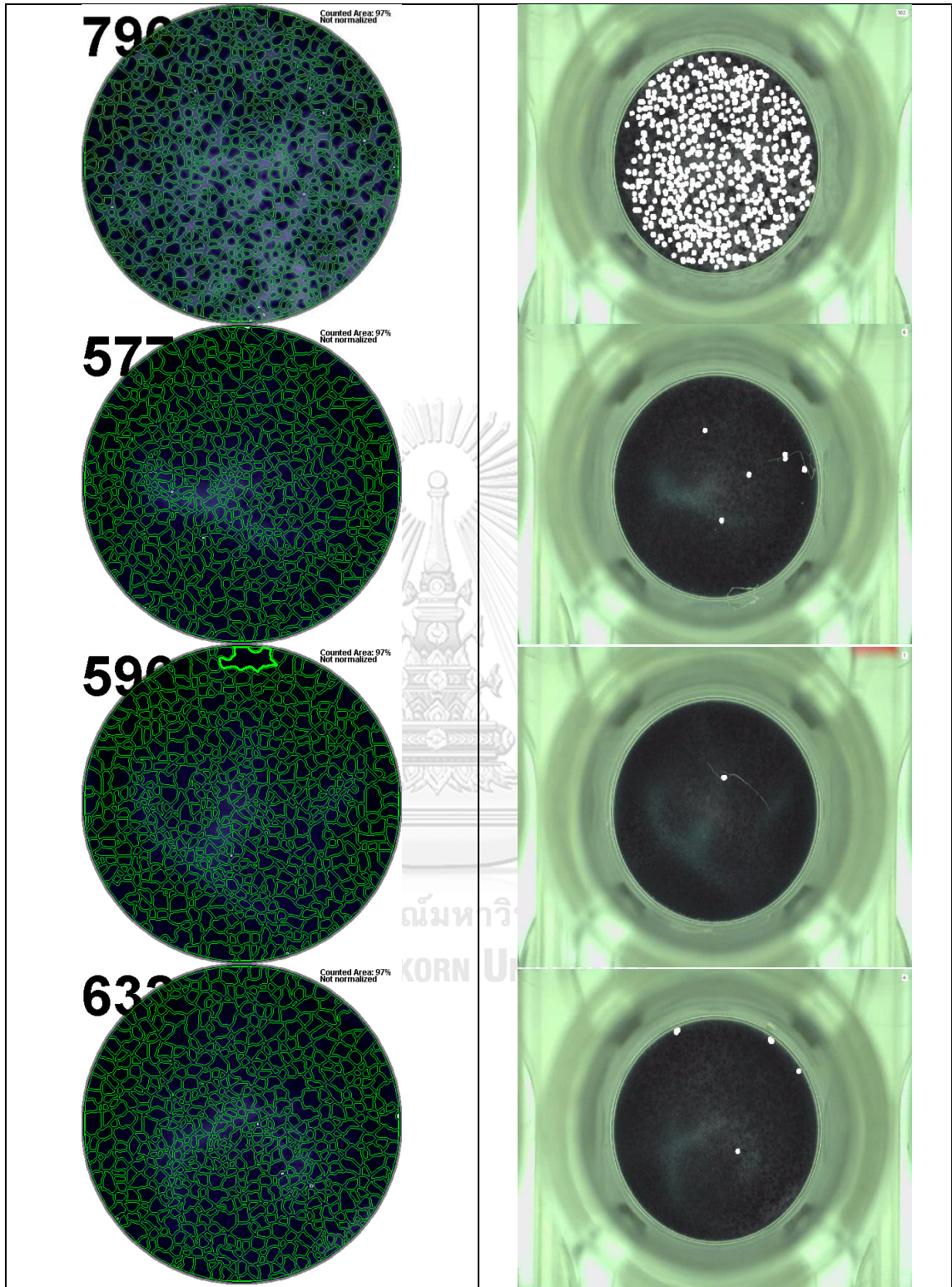


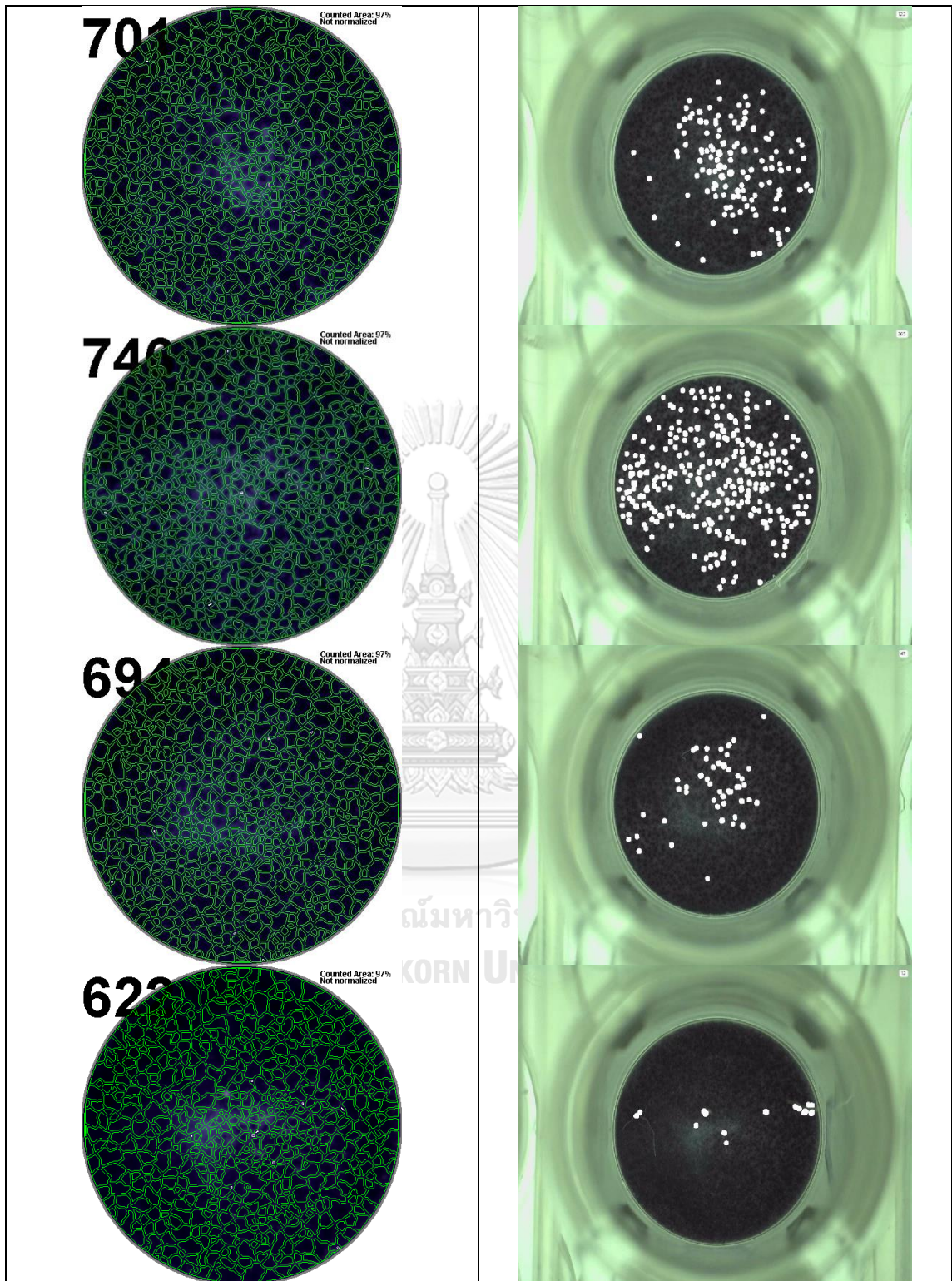


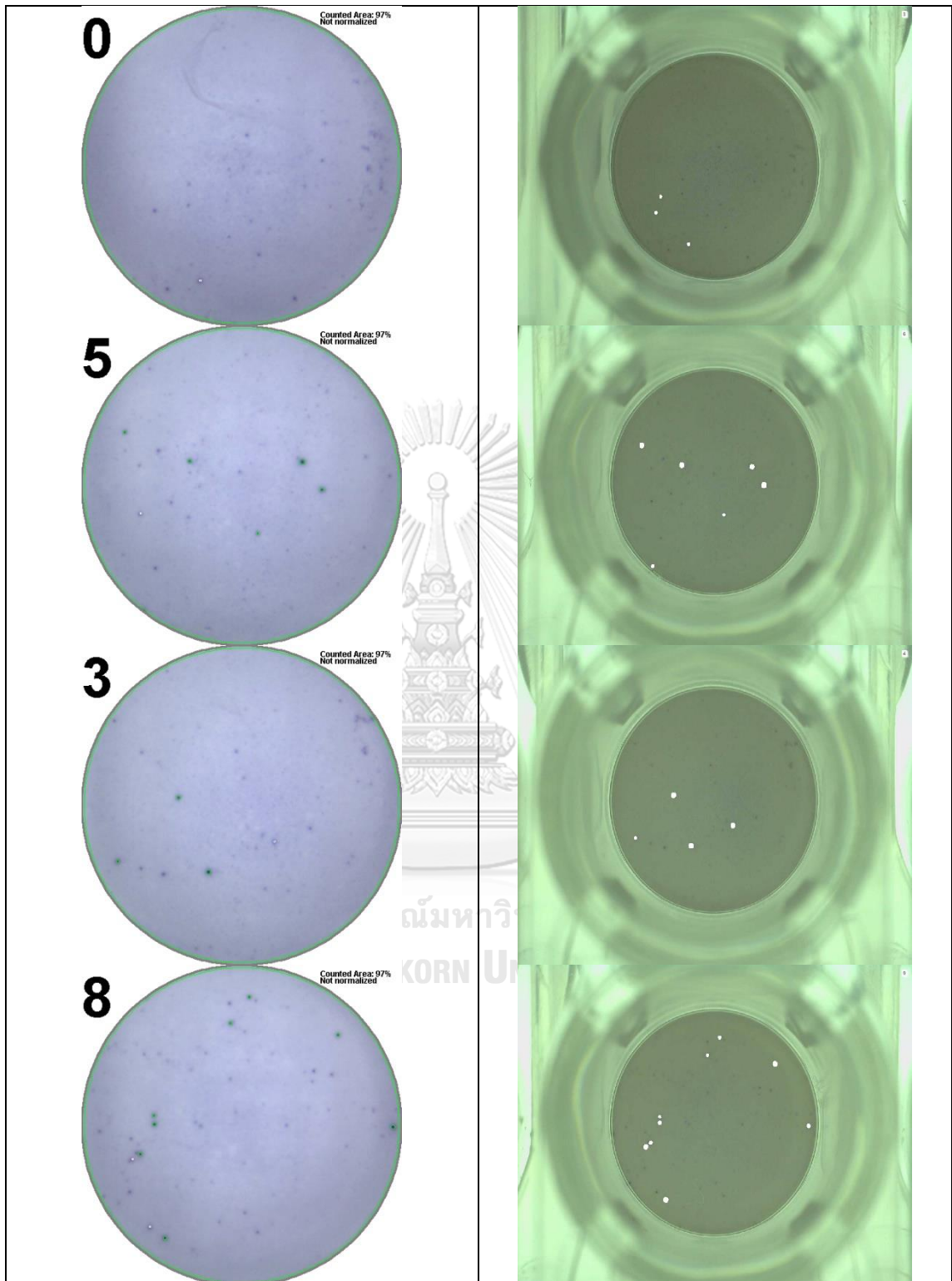


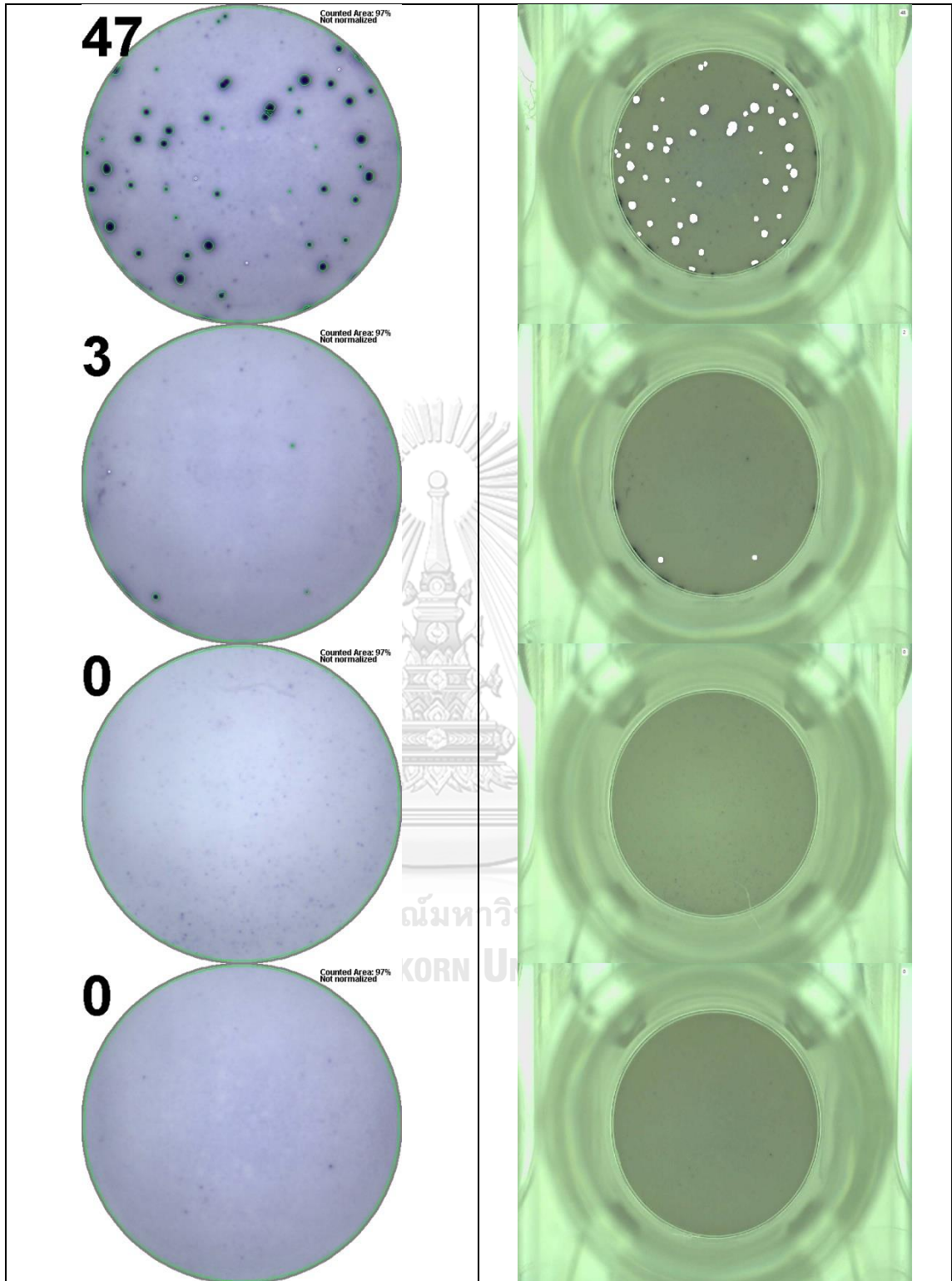


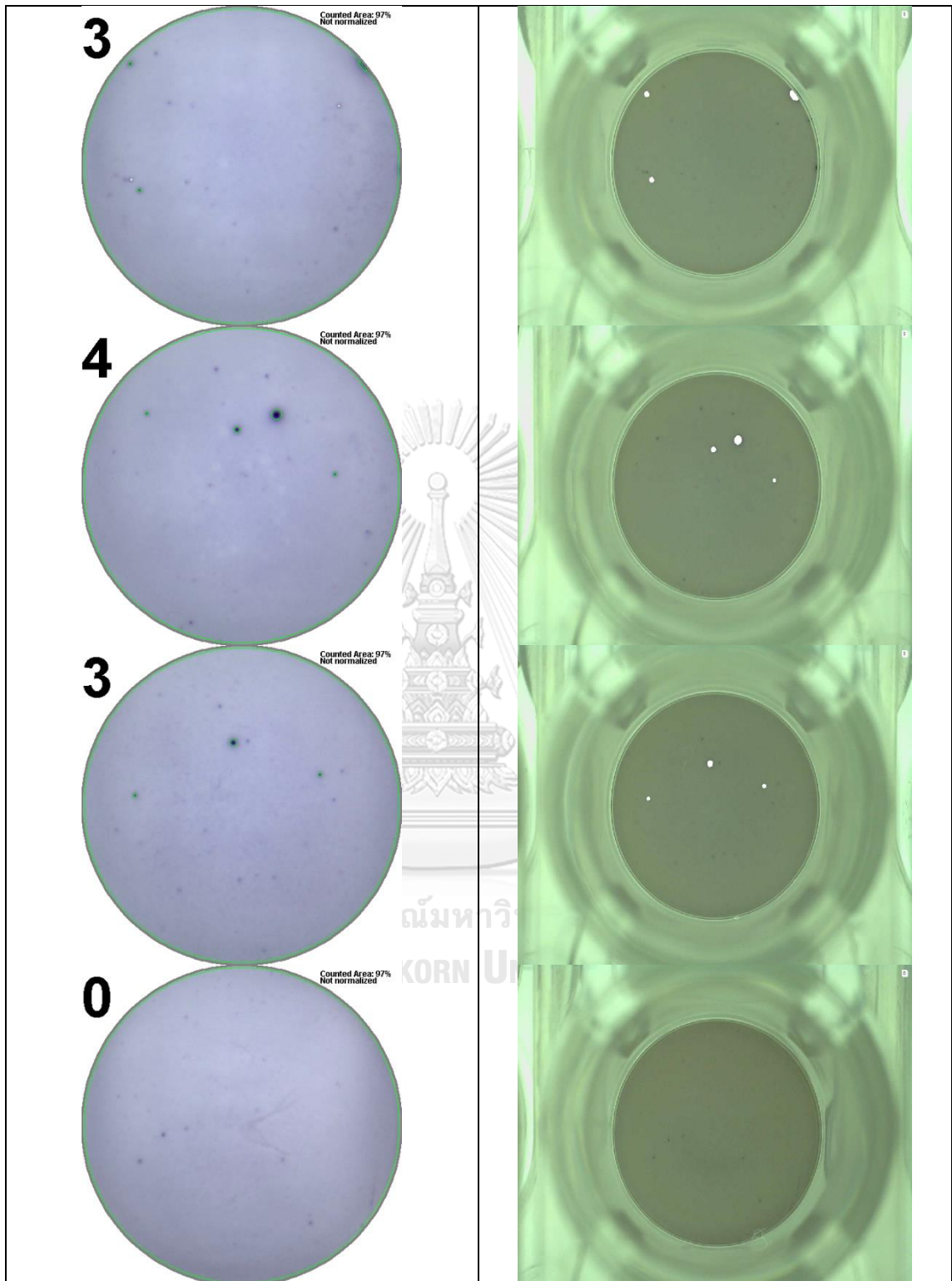


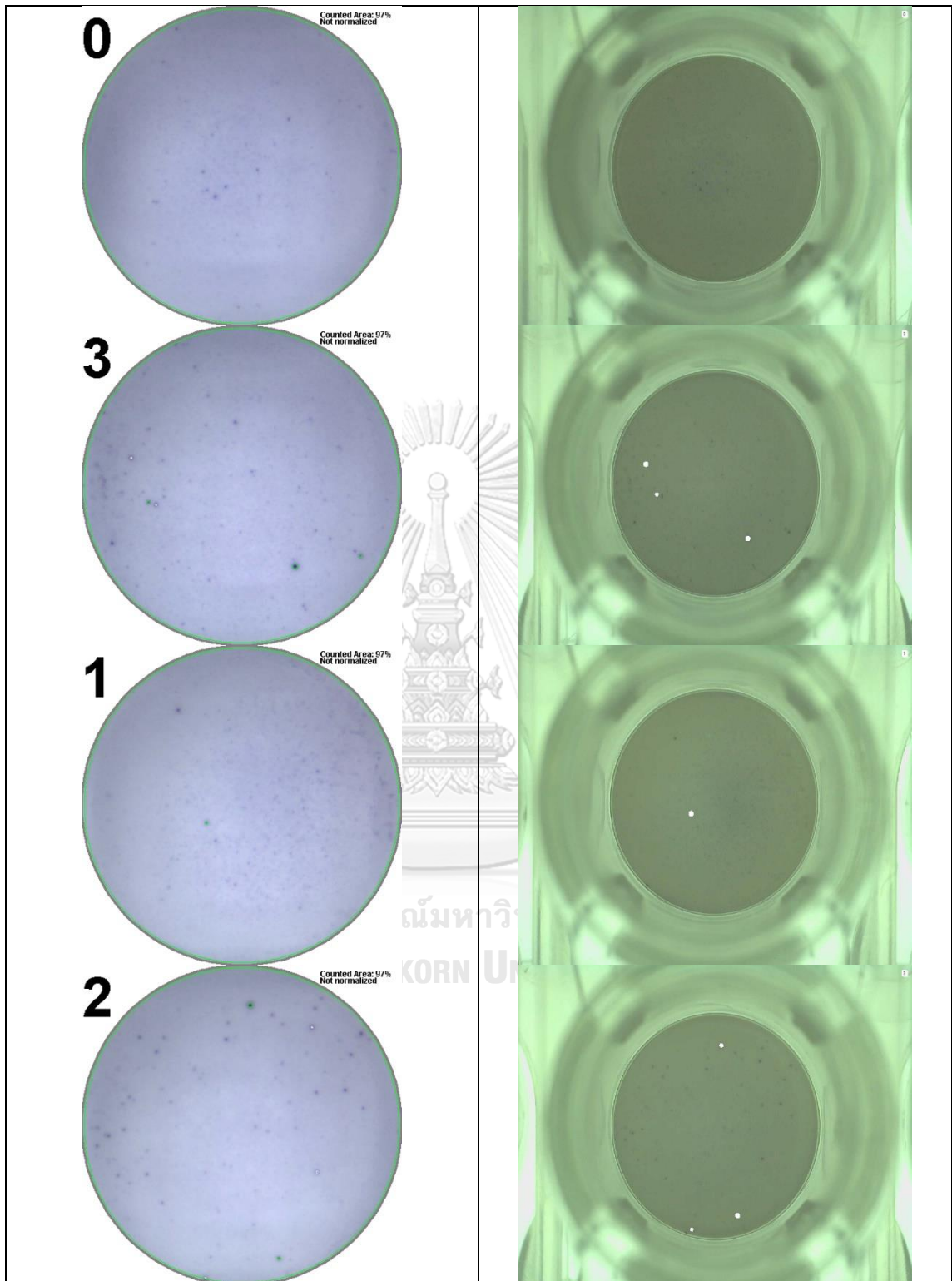




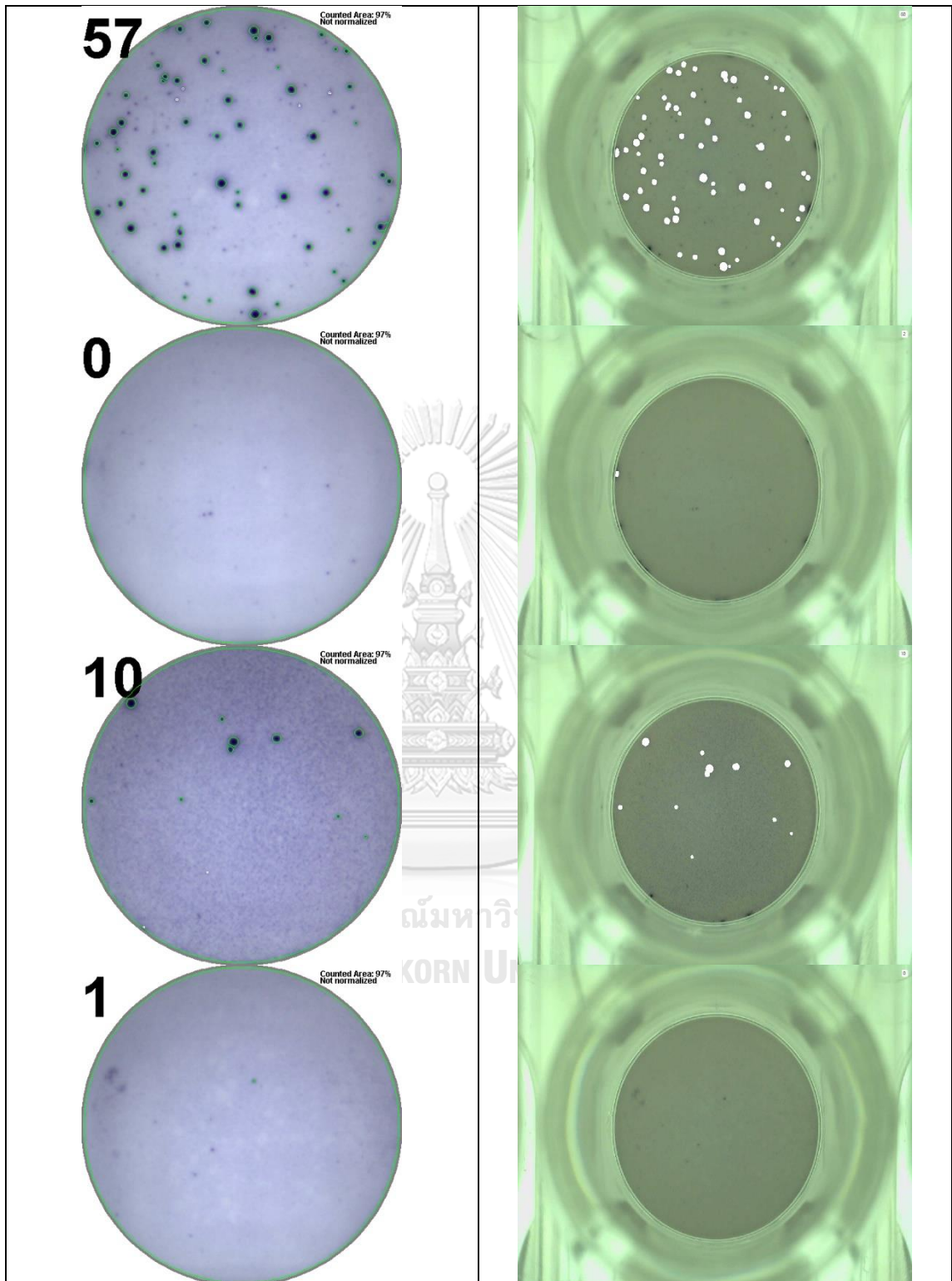


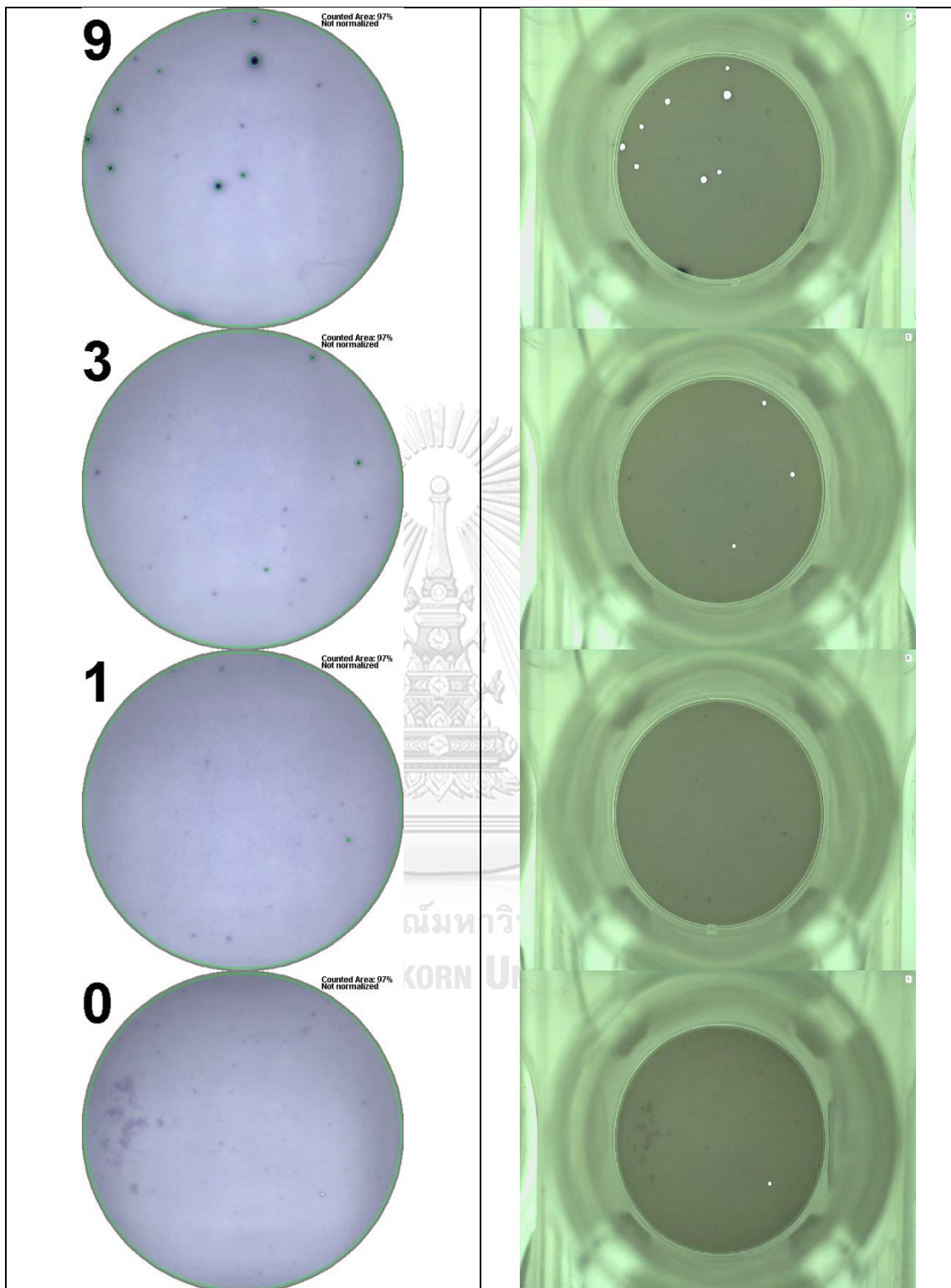


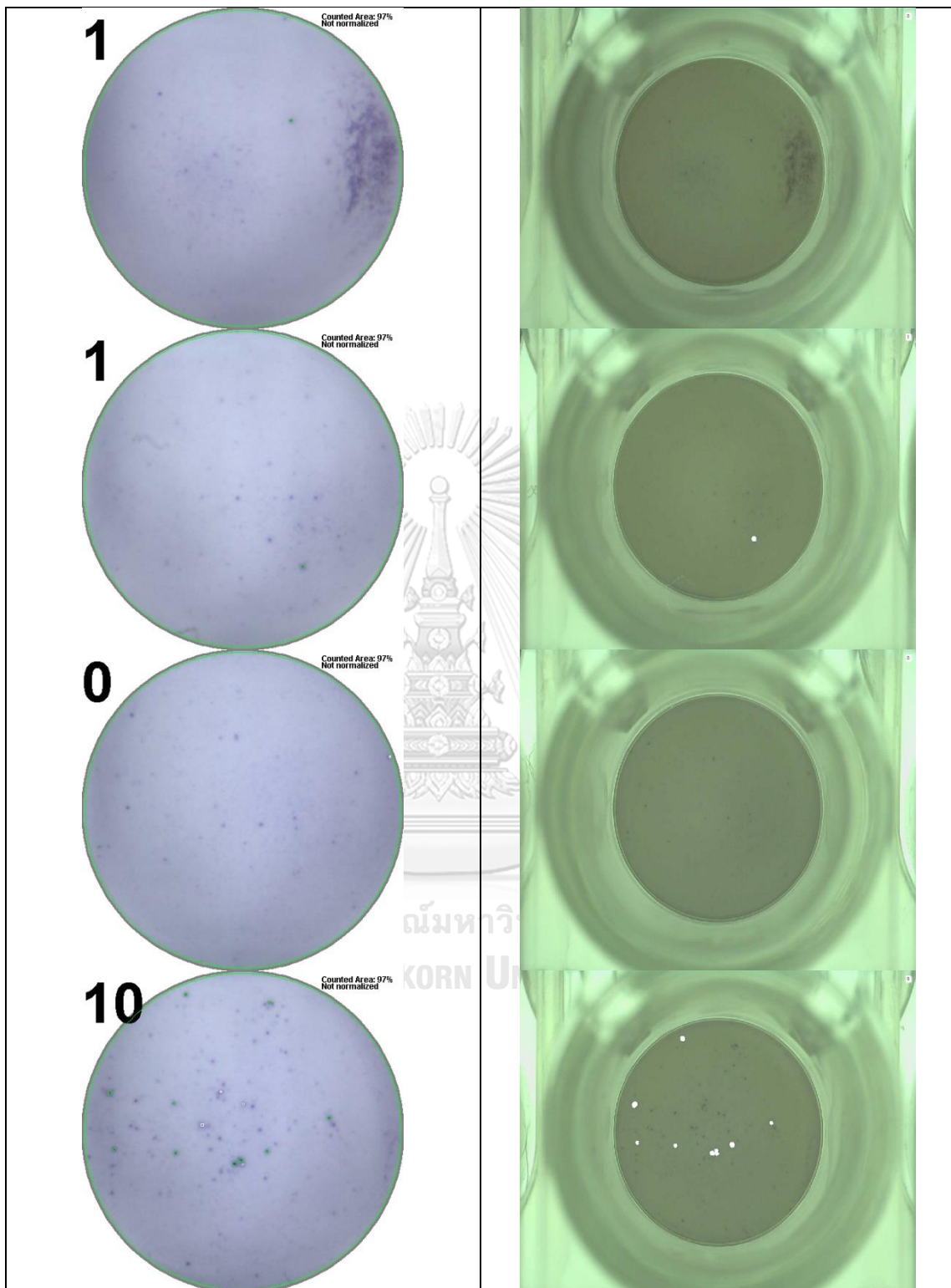


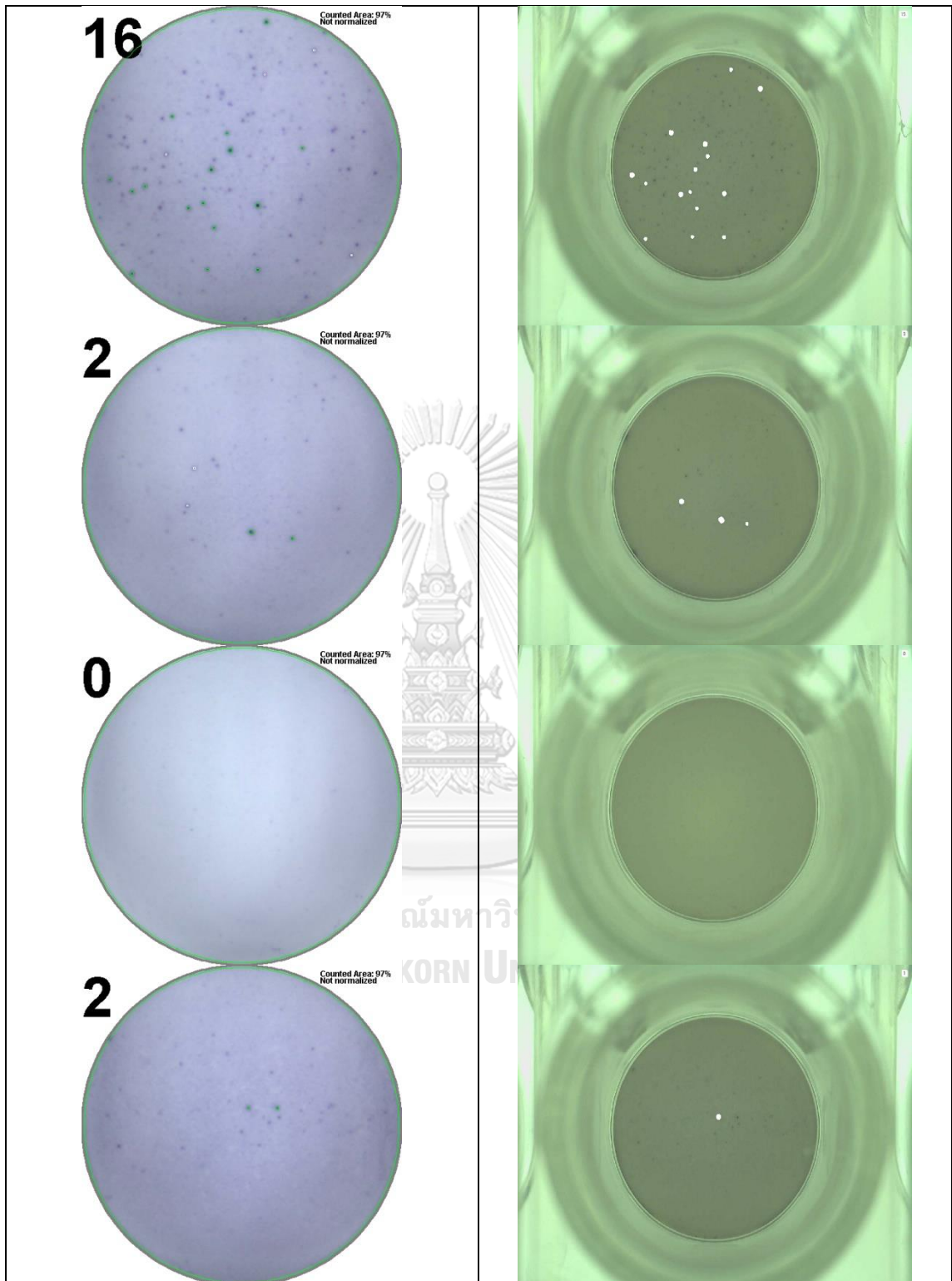


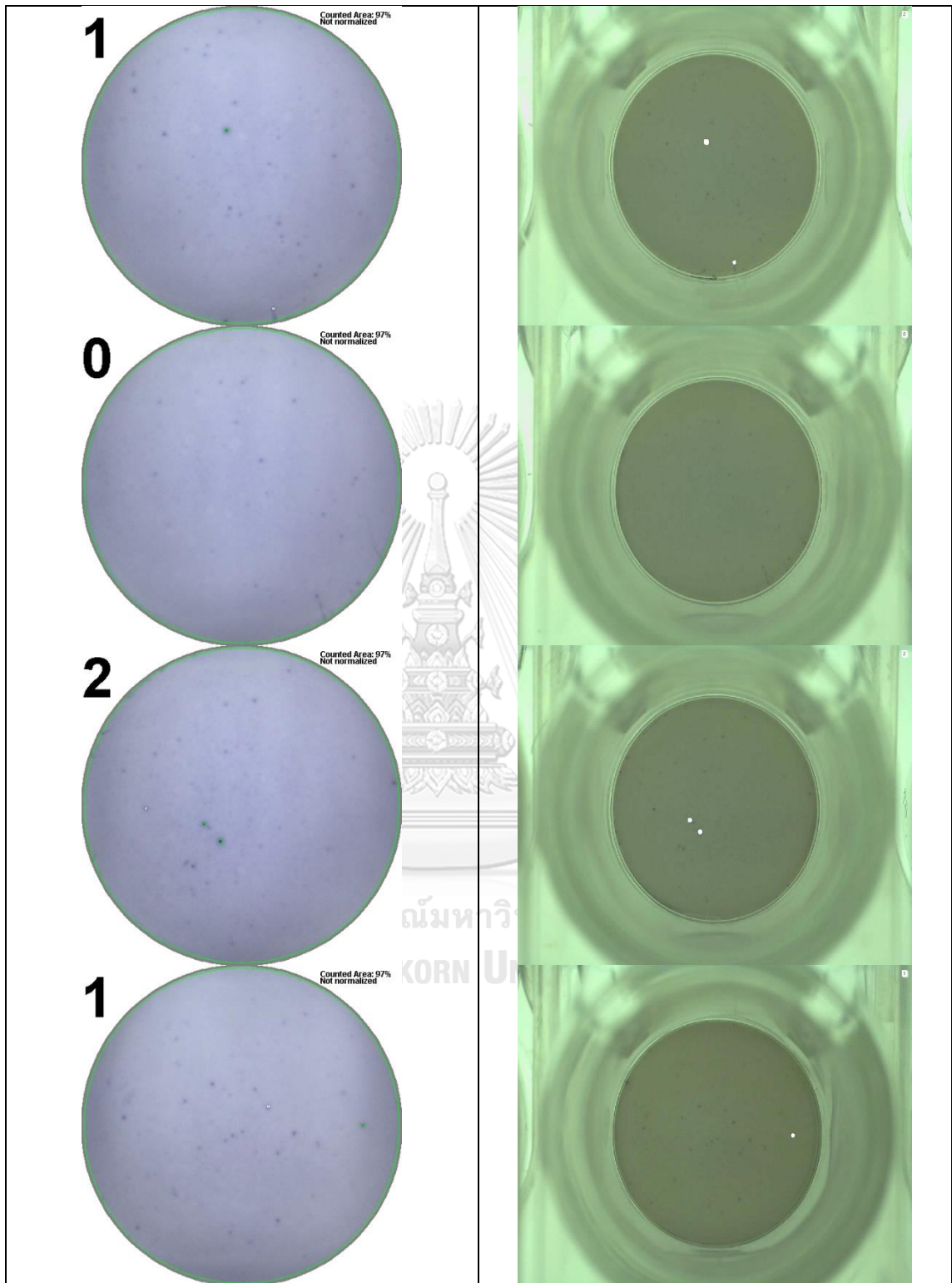














จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม

### Uncategorized References

1. Cytokine assays. [cited 2020 July 31]; Available from: <http://www.cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4709/html/6cytokine.html>.
2. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 109-121.
3. Slota, M., et al., *ELISpot for measuring human immune responses to vaccines*. Expert review of vaccines, 2011. **10**(3): p. 299-306.
4. Zhu, G., et al., *Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light*. Journal of microbiological methods, 2018. **153**: p. 66-73.
5. Mukherjee, D.P., et al., *Bacterial colony counting using distance transform*. International journal of bio-medical computing, 1995. **38**(2): p. 131-140.
6. Preamsatham, 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. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. *Distance Transform*. [cited 2020 July 31]; Available from: <https://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/distance.htm>.
8. Boonyasuppayakorn, S., et al., *Simplified dengue virus microwell plaque assay using an automated quantification program*. Journal of virological methods, 2016. **237**: p. 25-31.
9. feng Hu, Z. *Automated counting and identification of cell colonies based on distance transform and progressive erosion*. in *2013 International Conference on Advanced Computer Science and Electronics Information (ICACSEI 2013)*. 2013. Atlantis Press.
10. Brugger, S.D., et al., *Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates*. PloS one, 2012. **7**(3): p. e33695.

11. Hawkins, N., S. Self, and J. Wakefield, *The automated counting of spots for the ELISpot assay*. *Journal of immunological methods*, 2006. **316**(1-2): p. 52-58.
12. Jamil, N., T.M.T. Sembok, and Z.A. Bakar. *Noise removal and enhancement of binary images using morphological operations*. in *2008 International Symposium on Information Technology*. 2008. IEEE.
13. Beucher, S. *Use of watersheds in contour detection*. in *Proceedings of the International Workshop on Image Processing*. 1979. CCETT.
14. Cloppet, F. and A. Boucher. *Segmentation of overlapping/aggregating nuclei cells in biological images*. in *2008 19th International Conference on Pattern Recognition*. 2008. IEEE.
15. Ashraf, M.A., N. Kondo, and T. Shiigi, *Use of machine vision to sort tomato seedlings for grafting robot*. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 2011. **4**(4): p. 119-125.
16. Roth, R., *User Interface and User Experience (UI/UX) Design*. Geographic Information Science & Technology Body of Knowledge, 2017. **2017**.
17. *Dino-lite* [cited 2020 July 31]; Available from: [https://www.dino-lite.com/products01\\_list.php?index\\_m1\\_id=9&index\\_m2\\_id=35](https://www.dino-lite.com/products01_list.php?index_m1_id=9&index_m2_id=35)
18. *Technical Information Differences in parallel light backlight effect*. [cited 2020 July 29]; Available from: [https://moritex.com/products/mv/mv/bi-telecentric/parallel\\_backlight.html](https://moritex.com/products/mv/mv/bi-telecentric/parallel_backlight.html).
19. *Inspecting with backlight illumination*. [cited 2020 July 29]; Available from: <https://www.vision-doctor.com/en/illumination-techniques/backlight-illumination.html>.
20. *Introduction to Darkfield illumination*. [cited 2022 June 19]; Available from: <https://moticeurope.blogspot.com/2016/08/introduction-to-darkfield-illumination.html>.
21. *MODBUS* [cited 2020 July 31]; Available from: <https://community.st.com/s/question/0D50X0000B0OrZB/how-to-detect-modbus-rtu-end-of-frame-silent-interval-using-uart-interrupts>.
22. Norman, D., *The design of everyday things: Revised and expanded edition*. 2013: Basic books.



23. *Image Morphology*. [cited 2020 July 30]; Available from: <https://humancominteracg1.wixsite.com/group1/w2-morphological>.
24. Ikebe, M. and T. Asai, *A digital vision chip for early feature extraction with rotated template-matching CA*. *Journal of Robotics and Mechatronics*, 2005. **17**(4): p. 372.
25. Mukaka, M., *Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation in medical research*. *Malawi Med J*, 2012. **24**(3): p. 69-71.
26. Myles, P.S. and J. Cui, *I. Using the Bland–Altman method to measure agreement with repeated measures*. 2007, Oxford University Press. p. 309-311.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Chayatorn Kukiattikoon
วัน เดือน ปี เกิด	17 June 2539
สถานที่เกิด	Suratthani
ที่อยู่ปัจจุบัน	8/28 Rhythm sukhumwit 50 bangkok



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY