



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
(INGENIERÍA AMBIENTAL) – (AGUA)

**Identificación y cuantificación automática de
huevos de helmintos en muestras de agua residual**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERÍA

PRESENTA:

BIÓL. JESSICA DAMARIS PÉREZ SÁNCHEZ

TUTORA PRINCIPAL

DRA. BLANCA ELENA JIMÉNEZ CISNEROS, INSTITUTO INGENIERÍA, UNAM
COMITÉ TUTORAL

DRA. ALMA CHÁVEZ MEJÍA, INSTITUTO INGENIERÍA, UNAM

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO INGENIERÍA, UNAM

DR. FERNANDO ARÁMBULA COSÍO, CCADET, UNAM

DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO, INSTITUTO BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. Noviembre, 2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: (DRA. ORTA LEDESMA MARÍA TERESA)

SECRETARIO: (DR. SALGADO MALDONADO GUILLERMO)

VOCAL: (DR. ARAMBULA COSÍO FERNANDO)

1 ER. SUPLENTE: (DRA. CHÁVEZ MEJÍA ALMA CONCEPCIÓN)

2 D O. SUPLENTE: (DRA. JIMÉNEZ CISNEROS BLANCA ELENA)

Lugares donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM
CCADET, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

DRA. BLANCA ELENA JIMÉNEZ CISNEROS

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Blanca puesto que su carrera es una inspiración para mí.

A la M. en C. Catalina Maya que sin ella esta tesis simplemente no hubiera sido la misma, muchas gracias por tu apoyo y soportarme.

A mis tutores puesto que cada uno cumple una función importante dentro de este documento.

A mi amada UNIVERSIDAD y en especial a este Instituto pues fue un triunfo haber entrado a tan reconocido lugar de investigación y desarrollo.

Al equipo de trabajo rotativo en este proyecto (Benja, Gustavo y Claudine) así como al Dr. Torner y a Sol por su apoyo en este proyecto multidisciplinario.

A mi familia que siempre ha estado ahí y en especial a ti bebé ♥ porque tuve que realizar sacrificios para poder iniciar y concluir este sueño, te llevo en mente siempre, perdóname.

A mis amigos que estuvieron desde el inicio en los cursos (Mario, Raúl, Claudia y Gaby) y otros durante el trayecto que son bastantes. Y a otros más que me han soportado durante muchos más años y son de los mejores amigos que hay. Gracias por siempre escucharme.

A ti Leinad por todo tu apoyo, sigue adelante ☺

A mi(s) furur@s hij@(s), esperando que les sirva de inspiración para que lleguen más lejos que yo.

A la fundación Bill & Melinda Gates por el apoyo al proyecto y por supuesto a CONACyT

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

*Muchas
Gracias*

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Clasificación de Helmintos	6
2.1.1 Clase Cestoda.....	6
2.1.2 Clase Trematoda.....	8
2.1.3 Clase Nematoda.....	10
2.2 Los huevos de los helmintos	13
2.3 Enfermedades ocasionadas por helmintos o helmintosis	14
2.4 Métodos para identificar y cuantificar huevos de helmintos en muestras ambientales	16
2.4.1 Estudios previos sistemas digitales para el procesamiento de imágenes	17
2.4.2 Sistemas digitales para huevos de helmintos.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo general	26
3.1 Objetivos particulares	26
ALCANCES.....	27
HIPÓTESIS.....	27
4. METODOLOGÍA.....	28
4.1 Comparación bibliográfica de los métodos de procesamiento de imágenes	28
4.2 Generación de archivo fotográfico y selección de especies	28
4.2.1 Manejo de la técnica tradicional para conteo de huevos de helmintos y generación de imágenes	29
4.4 Procesamiento de imágenes y desarrollo del algoritmo	31
Área y diámetro.....	37

Excentricidad.....	37
Compacidad.....	38
Entropía.....	38
Rugosidad del perímetro.....	39
Eje menor y eje mayor.....	39
4.5 Validación del sistema.....	40
4.5.1 Calidad del agua residual.....	40
4.5.2 Especificidad y sensibilidad	42
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
5.1 Comparación bibliográfica de los métodos del procesamiento de imágenes.....	44
5.2 Generación de archivo fotográfico y selección de especies.....	49
5.3 Manejo de la técnica tradicional para conteo de huevos de helmintos y generación de imágenes.....	61
5.4 Procesamiento de imágenes y desarrollo del algoritmo.....	63
5.4.1 Problemáticas que enfrentada por el algoritmo.....	64
5.5 Validación del algoritmo.....	65
5.5.1 Selección de características.....	66
5.5.2 Mejoramiento y ajustes del algoritmo de prueba.....	78
5.5.3 Pruebas de validación.....	82
5.5.4 Ventajas y desventajas del sistema desarrollado.....	88
6. CONCLUSIONES.....	91
7. BIBLIOGRAFÍA.....	94
ANEXO 1.....	101
ANEXO 2.....	105
ANEXO 3.....	119
ANEXO 4.....	124
ANEXO 5.....	125
ANEXO 6.....	129
ANEXO 7.....	133

CONTENIDO DE TABLAS

		Página
1.	Cantidad y características de huevos generados por algunas especies de helmintos	14
2.	Principales enfermedades transmitidas por helmintos	15
3.	Caracterización de tres tipos de calidades de agua residual	41
4.	Comparación de diferentes metodologías de procesamiento de imágenes para su aplicación en huevos de helminto.	46
5.	Archivo fotográfico e imagen de los huevos de helmintos en muestras limpias y sucias	49
6.	Características y claves principales de los huevos de helmintos seleccionados	62
7.	Matriz de confusión o contingencia. Primeras pruebas del algoritmo	76
8.	Resultados de especificidad y sensibilidad. Primeras pruebas del algoritmo	77
9.	Matriz de confusión. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo I. Pruebas finales del algoritmo	83
10.	Sensibilidad y especificidad. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo I. Pruebas finales del algoritmo	84
11.	Matriz de confusión. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo II. Pruebas finales del algoritmo	85
12.	Sensibilidad y especificidad. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo I	86
13.	Ventajas y desventajas del sistema	89

CONTENIDO DE FIGURAS

		Página
1.	Partes del cuerpo de un céstodo	7
2.	Ciclo de vida de los céstodos	8
3	Cuerpo de <i>Schistosoma mansoni</i> (tremátodo)	9
4	Ciclo de vida de <i>Schistosoma</i> sp	10
5	Ciclo de vida de los nematodos a) <i>Ascaris lumbricoides</i> ; b) <i>Toxocara Cati</i> y <i>T. canis</i>	12
6	Países con helmintosis	16
7	Estructura de un Clasificador Bayes, en la cual se observa la entrada de datos(c) y su interacción entre las variables propuestas (x1, x2, x3 y x4).	18
8	Imagen de células procesadas con escalamiento en grises	19
9	Etapas del procesamiento del quiste de protozooario	19
10	Proceso de transformación de la imagen por escala de grises	20
11	Imágen de células por inmunohistoquímica	20
12	Imagen de células cuando son positivas (negras) o negativas (grises) a tener núcleo.	21
13	Identificación digital de la imagen por Yang et al. (2001)	22
14	Huevo fértil de <i>Ascaris lumbricoides</i> antes y después del pre-procesamiento	23
15	Proceso de identificación de <i>Ascaris</i> por el método de Dogantekin et al. (2008)	24
16	Proceso de identificación de <i>Ascaris</i> por el método de Dogantekin et al. (2008)	24
17	Proceso de identificación por Dogantekin et al. (2008)	25
18	Celda de Sedgwich-Rafter para cuantificación de huevos de helmintos	30
19	Concentrados 3000h/mL de un total de 4 mL de muestra por especie de huevo de helmintos.	30
20	Grupos de características para la toma de imágenes	31
21	Algoritmo de procesamiento de las imágenes	35
22	Comparación de filtros en imagen	36
23	Excentricidad de una elipse	37
24	Compacidad de una figura	38
25	Eje menor de un objeto	39
26	Gráfica de identificación por áreas de las especies de huevos de helmintos	67
27	Distribución Gaussiana del diámetro entre las especies	68
28	Gráfica de identificación por excentricidad de las especies de huevos de helminto	69
29	Cálculo de la entropía de las diversas especies de huevos de helmintos	70
30	Distribución Gaussiana del eje mayor de las especies de helmintos seleccionadas	71
30	<i>A. lumbricoides</i> segmentado, se demarcan sus bordes por la línea blanca	71
31	<i>A. lumbricoides</i> segmentado con mayor aumento	73

32	<i>A. lumbricoides</i> y <i>T. solium</i> segmentadas	73
33	<i>A. lumbricoides</i> y <i>T. solium</i> segmentadas	74
34	Gráfica de validación de primeros resultados del Método tradicional (MT) y el Algoritmo de Detección (AD).	75
35	Mejoras realizadas en el proceso del algoritmo de detección	78
36	Área a ser considerada para el escalamiento de grises del procedimiento de segmentación en las mejoras del sistema	79
37	Promedio de perfiles anterior, central y siguiente para un área de huevo de helminto	80
38	Resultado final de la imagen procesada (<i>S. mansoni</i>)	81
39	<i>Hymenolepis diminuta</i> para su segmentación final	82
40	Resultados de pruebas finales del algoritmo. Detección por especie para agua tipo I.	87
41	Resultados de pruebas finales del algoritmo. Detección por especie agua tipo II	87
42	Software instalado en laboratorio	90

RESUMEN

En la actualidad el tratamiento aplicado al agua residual puede reducir en mucho las concentraciones de organismos patógenos; sin embargo, aún es muy difícil asegurar su completa eliminación, por lo que este tipo de agua se convierte en un vehículo de transmisión de organismos patógenos, como son los helmintos. Los helmintos son gusanos parásitos que en su estadio de huevo infectan a comunidades con bajo nivel de saneamiento, causando enfermedades intestinales, por ello la importancia de identificarlos y cuantificarlos con la mayor precisión posible. Dado que el método convencional de identificación de estos organismos depende de la capacidad del ser humano para reconocerlos, es necesaria siempre la intervención de personal experto en dicha identificación, pues al llevarse a cabo de manera visual, representa la principal fuente de incertidumbre y requiere de un muy buen entrenamiento y práctica continua por parte del analista. Considerando esto se propone una nueva metodología basada en el procesamiento y clasificación de imágenes para la identificación y cuantificación automática de huevos de helmintos a través de imágenes capturadas en microscopio óptico, con lo cual se busca simplificar la técnica analítica establecida y reducir los costos y el tiempo del análisis. Esta tesis se centró en el desarrollo de un software para identificar y cuantificar de manera automática imágenes de huevos de helmintos de diferentes especies, con la finalidad de que se pueda desarrollar en un futuro un sistema para laboratorios de control ambiental y de investigación no sólo a nivel nacional sino que pueda ser distribuido internacionalmente.

Dada la complejidad del análisis automático de imágenes biológicas, se realizó un estudio comparativo de los protocolos de reconocimiento disponibles así como de las técnicas de procesamiento de imágenes aplicables a este estudio. Para el desarrollo de la técnica de identificación automática se emplearon 360 imágenes de especies (*Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris trichiura*), las cuales permitieron entrenar al sistema y establecer un intervalo de valores para cada propiedad de clasificación. La validación del sistema siempre se llevó a cabo con muestras de agua

residual y se utilizaron comúnmente tres calidades diferentes con base al contenido de sólidos suspendidos totales (SST). La clase I se denominó para agua con < 10 mg/L (SST), donde los huevos estaban casi completamente libres de otros objetos, la clase II para el agua con un intervalo de 10 a 150 mg/L de SST donde se tenía una cantidad de sólidos equivalente a un efluente de la etapa de clarificación de una planta de tratamiento y la clase III > 150 mg/L SST, donde la calidad es la propia de una agua residual sin tratamiento; esto permitió validar los resultados según la cantidad de sólidos presentes. Para el agua clase I y clase II, se obtuvieron resultados de especificidad de la identificación de 0.99 y 0.98, respectivamente, lo que indica que el sistema es capaz de distinguir con significativa exactitud entre un huevo de helminto y objetos diferentes. Para esas mismas calidades de agua, se obtuvo una sensibilidad de 0.83 y 0.80, respectivamente, lo que indica que la capacidad del sistema para identificar una especie entre las demás supera el 80%. Para el caso del agua clase III, la eficacia de identificación fue considerablemente menor (15%) que para las muestras de clase I o II. Así que en las condiciones actuales del sistema y para el caso de muestras de aguas residuales con alto contenido de sólidos, se debe llevar a cabo, una dilución previa de las muestras antes de su identificación y cuantificación a través del software.

Las ventajas del sistema desarrollado frente a la técnica tradicional son: a) No se requieren habilidades específicas del personal para el reconocimiento de las especies. b) Muestras con diversa cantidad de sólidos suspendidos totales pueden ser identificadas en aproximadamente 10 minutos contra tres horas o más de la técnica tradicional. c) El costo inicial del software es de 30,000 dls frente a 20,000 dls de la técnica tradicional, pero el costo operativo por muestra es menor en el caso del software, con 2 dls por muestra contra un mínimo de 10 dls y máximo 35 dls de la técnica tradicional. En cuanto a la especificidad y sensibilidad del software desarrollado, ambas características superan el 80%, mientras que la técnica tradicional depende de las habilidades humanas previamente adquiridas.

ABSTRACT

Nowadays, the treatment applied to residual water can greatly reduce the concentration of pathogens, but it is still difficult to ensure complete removal, so the water is the vehicle for transmission of pathogenic organisms such as the helminths. Helminths are parasitic worms that infect communities with low levels of sanitation, causing intestinal diseases, hence the importance of identifying and quantifying them as accurately as possible. Since the conventional method of identifying these organisms depends on the ability of humans to recognize them, is always needed the assistance of an expert in such identification, because it requires a very good training and a continual practice on analysis. Considering this, we propose a new methodology based on image processing and classification for automatic identification and quantification of helminth eggs through optical microscope captured images, which aims to simplify the established analytical technique, reduce costs and analysis time. This thesis focused on the development of software for identifying and quantifying automatically helminth eggs images of different species, in order to develop a system for environmental control laboratories and research, not also at national level, it goes internationally.

Given the complexity of biological automatic image analysis, we performed a comparative study of protocols for image processing techniques applicable for this study. The development of automatic identification technique used 360 images of different species (*Ascaris lumbricoides* (fertile and infertile), *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* and *Trichuris trichiura*), which allowed train system and establish a range of values for each property classification. System validation is always performed with residual water samples, we commonly used three different qualities based on the total suspended solids (TSS). Class I was called to water <10 mg / L (STS), here the eggs were almost entirely free of other objects; Class II water with a range of 10 to 150 mg / L (TSS) which had a solids amount equivalent to effluent clarification stage of a treatment plant and finally Class III >150 mg / L (TSS), where quality is typical of an untreated wastewater. This allowed us to validate the results according to the amount of solids present in water. For Class I and Class II, results were obtained identifying specificity 0.99 and 0.98, respectively, indicating that the system is able to distinguish between significant accuracy helminth egg and different objects. For the same quality of water, yielded a sensitivity of 0.83 and 0.80, respectively, indicating that the system's ability to identify a species among other exceeds 80%. The Class III identification efficiency was considerably lower (15%) than samples I or II. So in the current conditions of the system, must be carried out a prior dilution of the samples before identification and quantification through software. The advantages of the developed system versus the traditional technique are: a) No specific skills required for the recognition of the species. b) Samples with different amount of total suspended solids can be identified in approximately 10 minutes against three hours or more of the traditional technique. c) The initial cost of the software is 30,000 compared to 20,000 dls of the traditional technique, but the operating cost per sample is less in the case of software with 2 dls per sample versus 10 - 35 dls for traditional technique. Regarding the specificity and sensitivity of the developed software, both features exceed 80%, while the traditional technique depends on previously acquired human skills

INTRODUCCIÓN

El reúso de agua residual contribuye al uso eficiente del agua, particularmente en los países áridos y semi-áridos (Blumenthal et al., 2001). De acuerdo con la WHO (2006), el reúso del agua residual para riego incrementa el rendimiento de los cultivos por el aporte de nutrientes, suministro de agua todo el año que, además, evita el vertido de contaminantes a ríos, presas y lagos y libera el agua de primer uso para otros fines, como el de consumo humano (Jiménez, 2007 y Page *et al.*, 2010). Sin embargo, su uso también puede representar un riesgo para la salud pública (Assavasilavasukul, 2008 y Page et al., 2010), principalmente por el alto contenido y variedad de organismos patógenos capaces de sobrevivir tiempo suficiente para ser transmitidos a los cultivos, y con ello a los humanos (Ayres et al., 1992).

Entre estos patógenos destacan los helmintos, gusanos parásitos ampliamente distribuidos en la naturaleza con un concepto evolutivo muy discutible y amplia variedad de especies morfológica y fisiológicamente distintas (Botero, 2003). El elevado riesgo de infección se debe a su gran persistencia en el ambiente, de meses hasta varios años, así como a su baja dosis infectiva (WHO, 2006). Se estima que más de 3,500 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas por helmintosis (WHO, 2012).

Por ello, desde 1989 la WHO recomendó limitar el contenido de los huevos de helmintos (etapa infectiva del ciclo de vida) en el agua residual que se emplea para riego a <1 huevo por litro (HH/L). Posteriormente, en 1993 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) estableció un límite de 0.25 huevo/g (HH/g) para el caso de los biosólidos en el 2006, la WHO ratificó la importancia de regular los huevos de helmintos en el agua y lodos para reúso en la agricultura, así como en la acuicultura. Para el caso de México, desde 1983 el uso de aguas residuales para riego está permitido en condiciones controladas y a partir de 1999 se estableció el límite máximo permisible de <1 HH/L para riego restringido y de <5 para riego no restringido (NOM-001-SEMARNAT-1996). Estos son algunos criterios difíciles de cumplir, tanto a nivel internacional como nacional, por la falta de una técnica analítica adecuada, en particular en términos de la capacidad requerida por los analistas para la identificación y cuantificación de los diferentes géneros y especies de

huevos de helmintos, así como del tiempo y costo que ello representa, por lo que la evaluación y el valor reportado queda en duda.

Una posible solución a esta problemática es la aplicación de sistemas automáticos o programas de cómputo que se han empleado para la identificación de los huevos de los helmintos desde el año 2001 (Yang et al., 2001). No obstante dichos sistemas se ha aplicado sólo a matrices de muestras clínicas o de Atlas adquiridos de universidades, como el caso de Dogantekin et al., 2008; Acvi et al., 2009; Chuctaya et al., 2010.

Debido a ello, el objetivo del presente trabajo fue diseñar un programa de cómputo basado en el reconocimiento de imágenes para identificar y cuantificar diferentes especies de huevos de importancia médica y de mayor frecuencia en muestras de agua residual de diferentes calidades, de forma confiable, a un costo y tiempo menores, en comparación con la técnica analítica norma (NMX-AA-113-SCFI-2012). Todo el software de procesamiento y análisis de imágenes digitales fue desarrollado en colaboración con el Laboratorio de Imagenología Biomédica del CCADET, UNAM.

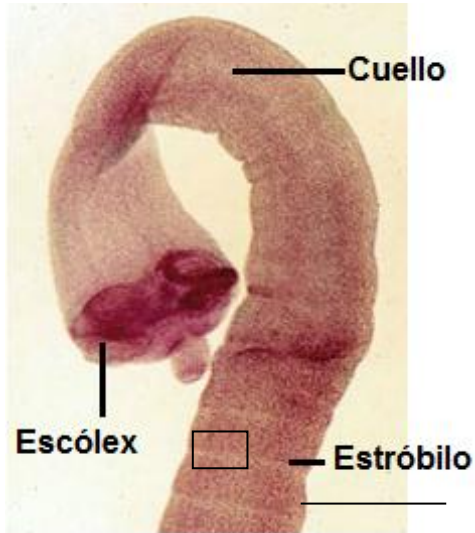
ANTECEDENTES

1.1. Clasificación de Helmintos

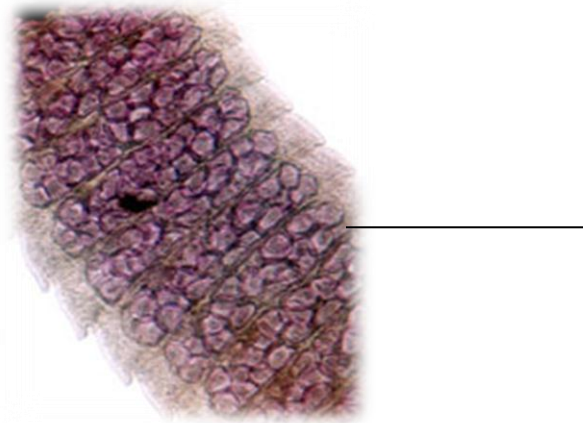
Los helmintos pertenecen a un grupo artificial de organismos, es decir, la denominación «helminto» es un concepto sin valor taxonómico que significa gusanos parásitos. Estos se clasifican en tres Filum: a) Platelmintos, siendo los gusanos planos, presentando cuatro clases dentro de este filum, pudiendo ser individuos marinos, dulceacuícolas o completamente parásitos (Clase Turbellaria- de vida libre; Trematoda, Monogenea y Cestoda- parásitas); b) Acantocéfalos, constituyen un filum pequeño, pero sumamente interesante, ya que establecieron una relación parásita en la cual ocasionalmente producen daños importantes al hospedero y c) Nemátodos, siendo un grupo muy numeroso, hay nemátodos parásitos, de invertebrados, vertebrados, de plantas y algunos son de vida libre (dulceacuícolas, marinos y terrestres). Entre los parásitos de vertebrados existen nematodos de importancia sanitaria y veterinaria (Calderón, 2004).

1.1.1. Clase Cestoda

La clase Cestoda agrupa cerca de 4,000 especies, siendo todas endoparásitas ya que habitan en los órganos de los seres vivos, colonizándolos cuando el huevo se ingiere por medio de agua, comida contaminada, copépodos parasitados o cisticercos en la carne de puerco. El cuerpo de estos organismos está formado por tres secciones: escólex, cuello y estróbilo. Este último se compone de proglótidos que a medida en que se alejan del cuello, maduran y desarrollan los huevos (Fig.1).



(A) Escólex y segmento anterior *H. nana*. Imagen modificada de Dr. Jorge Tay Z., Fac. Medicina, UNAM



(B) Proglótidos grávidos *H. nana*. Imagen: Dr. Jorge Tay Z., Facultad de Medicina, UNAM

Fig. 1 (A) Partes del cuerpo de un cestodo. (B) Proglótido grávido con huevos

Los huevos contienen una larva llamada hexacanto, que se encuentra rodeada por la membrana, que al ser disuelta por los jugos gástricos del estómago permite a los embriones activos eclosionar y circular por el organismo, hasta establecerse finalmente en él. Los quistes o cisticercos, es decir la forma juvenil del cestodo, se establecen en el cerebro, ojos, sistema nervioso, músculo esquelético y en el tejido subcutáneo de dos

a cuatro meses después de la infección (Flisser y Tamayo, 2006). En la Fig. 2 se presenta el ciclo de vida de los cestodos.

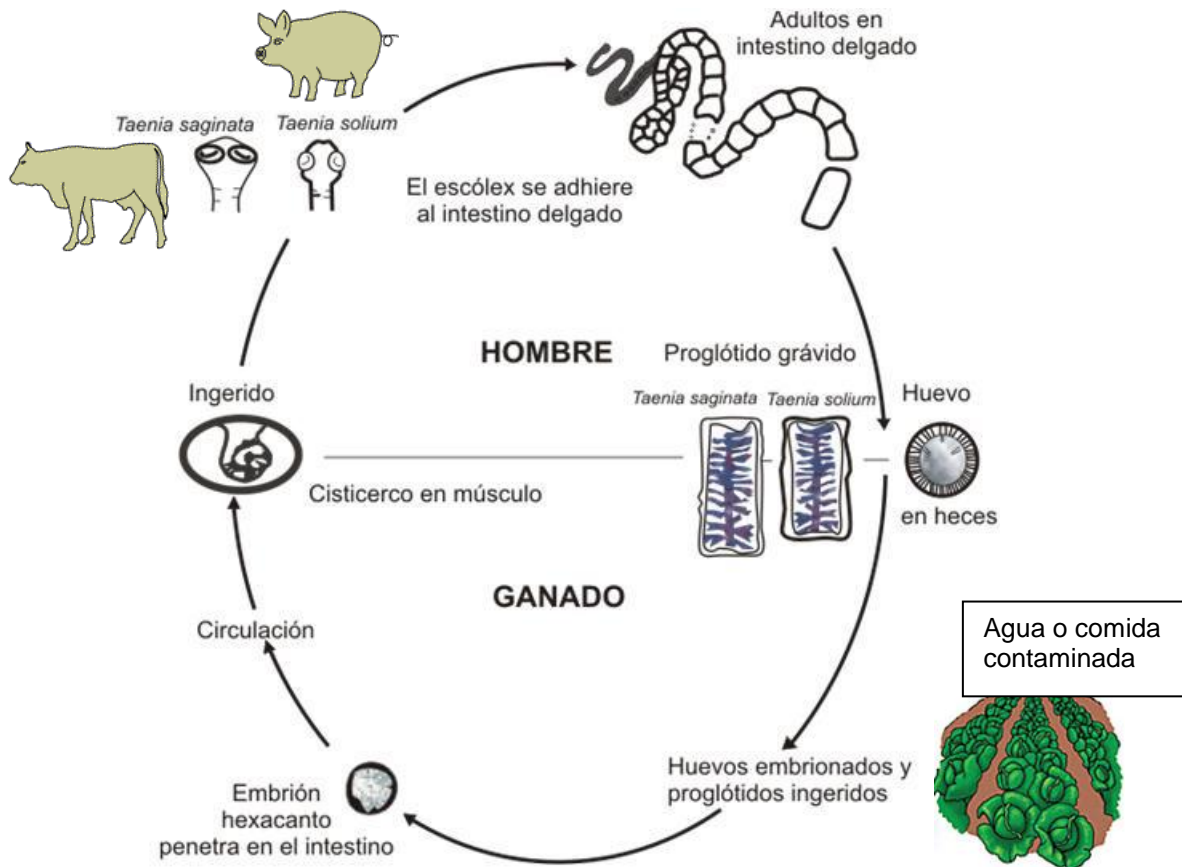


Fig. 2 Ciclo de vida de los cestodos. Modificado de CDC (Fuente: Jiménez et al., 2010).

1.1.2. Clase Trematoda

Los trematodos constituyen un grupo heterogéneo de gusanos planos (platelmintos), que agrupa al mayor número de helmintos, después de los nemátodos. Son parásitos de todas las clases de vertebrados, ya sea en su fase juvenil o adulta. Un número limitado de trematodos tienen importancia médica, pero varias especies causan severas pérdidas económicas debido a las parasitosis que producen en ganado y animales domésticos (Fried y Abruzzi, 2010). Son todos parásitos obligados de vertebrados con ciclos biológicos complejos con huéspedes e intermediarios. Tienen un aspecto foliáceo aplanado, es decir tipo hoja y el rango de su tamaño va de varias micras hasta

centímetros. Poseen órganos de fijación, como ganchos y ventosas, así como glándulas en la epidermis (Fig. 3).

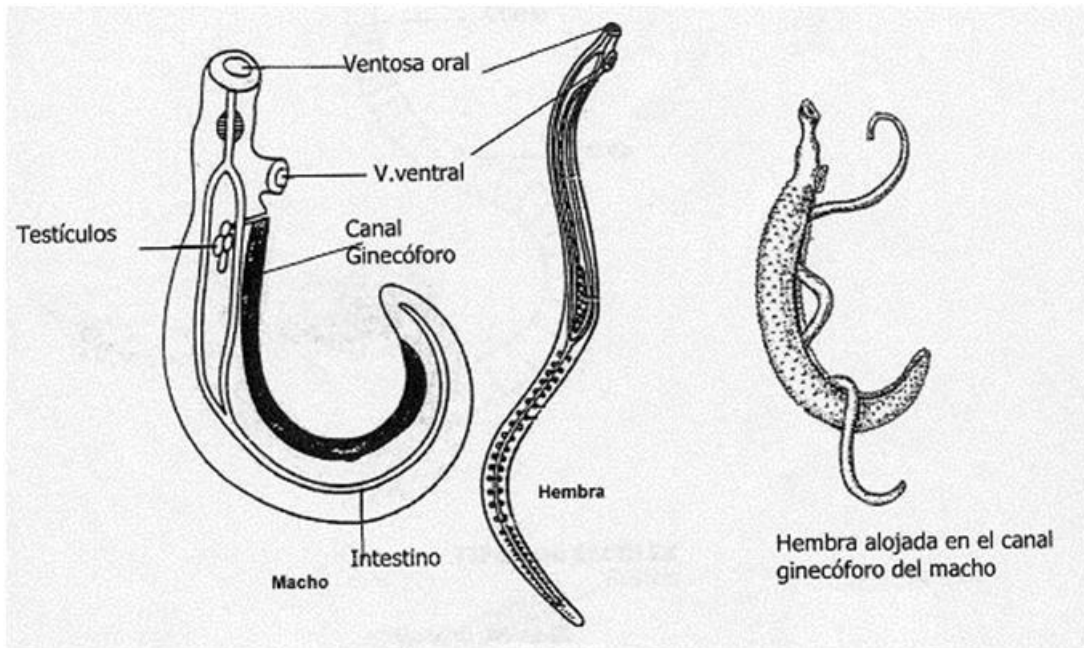


Fig. 3 Cuerpo de un trematodo (*Schistosoma* sp.)
(Modificado de Ron Koss, 2007)

Los trematodos de importancia médica mundial se ubican en la subclase Digenea, entre ellos los géneros *Fasciola*, *Clonorchis* y *Epistorchis* (hígado), *Fasciolopsis*, *Heterophyes*, *Metagonimus* y *Echinostoma* (intestino delgado), *Paragonimus* (pulmones), *Schistosoma mansoni* (hemático) (Keiser y Utzinger, 2009). Presentan ciclos de vida complejos que incluyen habitualmente uno o dos hospederos intermediarios y el hospedero definitivo, estos varían dependiendo de la especie. Los huevos eliminados mediante las heces eclosionan en el medio acuático y dan lugar a miracidios, larvas ciliadas acuáticas que penetran en el primer hospedero intermediario, generalmente un molusco (caracol). Posteriormente, dan lugar a las ¹cercarías, las

¹ Cercarías: Forma larval del parásito liberado del primer hospedero intermediario que es el caracol.

cuales son la etapa infectiva del helminto. Las cercarias del género *Schistosoma* penetran por la piel del hospedero para infectarlo, mientras que hay algunas que pueden adoptar una forma quística conocida como metacercaria (en el caso de *Fasciola* sp.) y ser ingeridas por el hospedero definitivo mediante la ingesta de vegetación acuática u objetos inanimados (Smicht & Roberts, 2000). La ingestión por el hospedero definitivo cierra el ciclo del parásito, alcanzando la madurez (Fig. 4) (Lefebvre y Poulin, 2005).

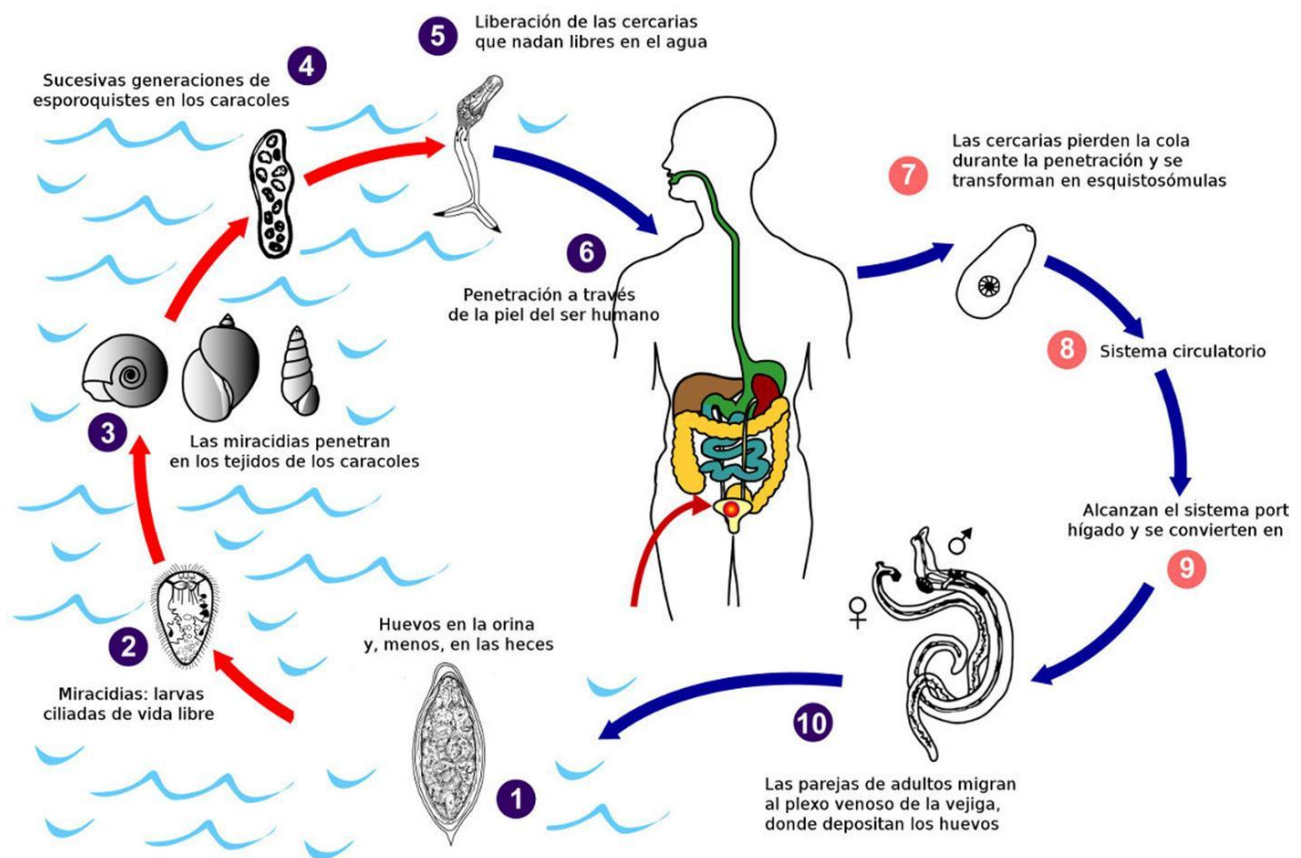
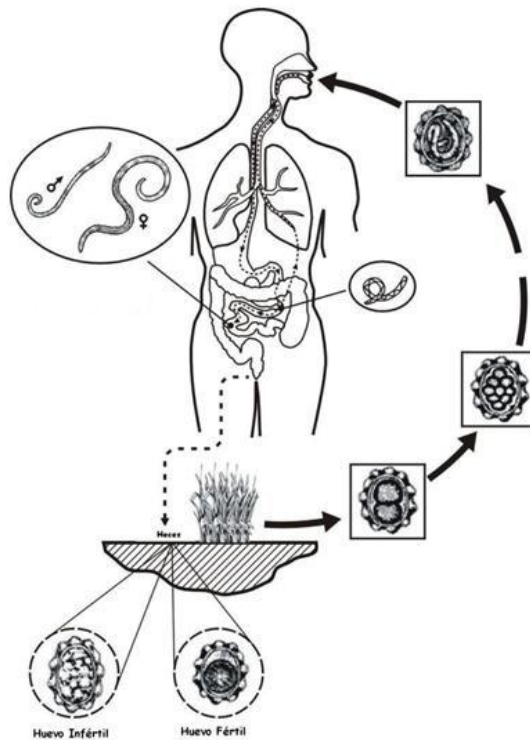


Fig. 4 Ciclo de vida de *Schistosoma* sp. (Fuente www.dpd.cdc.gov/dpdx).

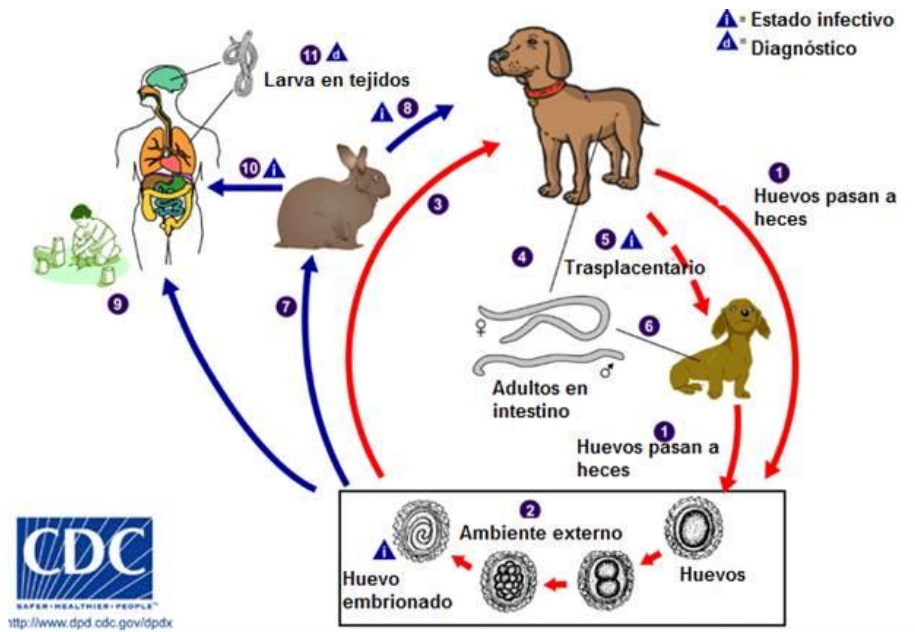
|1.1.3. Clase Nematoda

Los nematodos son gusanos parásitos cilíndricos, fusiformes o filiformes. Existen alrededor de un millón de especies (Mendoza y Alatorre, 2011); siendo los nematodos

intestinales los más frecuentes. Se transmiten por vía digestiva y dan lugar a parasitismos intestinales por medio del gusano adulto, que en la mayoría de los casos no produce manifestaciones clínicas (Pumarola, 1987). Los ciclos biológicos de los nematodos son muy variados dependiendo de su especie (Fig. 5 A y B). La fase parasitaria se lleva a cabo en el interior del hospedero definitivo, mientras que la fase pre-parasitaria ocurre como fase libre en el ambiente. El ciclo de vida de *A. lumbricoides* empieza cuando los huevos no fecundados son eliminados mediante las heces, pasando al suelo para terminar su desarrollo y originar una larva infectante; cuando el hospedero (humano o animal) ingiere los huevos por falta de higiene o alimentos contaminados, las larvas emergen y migran a diversas partes del cuerpo (Ash y Orihel, 2010). Para el caso de *Toxocara* sp., son parásitos específicos de perros y gatos, encontrándose en todo el mundo. Los huevos son muy resistentes en el medio ambiente y pueden permanecer infectivos durante meses. Las hembras depositan huevos en el intestino delgado, que salen con las heces, La fase infectante es la larva que se desarrolla en el huevo por semanas; posteriormente la liberación de la misma se produce hasta ser ingerido por un hospedador, en cuyos tejidos se encapsula y permanece infectante, Este parásito al momento de transmitirse al humano por falta de higiene o agua contaminada, puede provocarle síntomas y lesiones tanto viscerales como oculares, suele ser más frecuentes en niños que en adultos (Cuamba, 2008).



A) Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides* (Fuente: Jiménez et al., 2010).



B) Ciclo de vida *Toxocara Cati* y *T. canis* (Modificado de CDC)

Fig.5 Ciclo de vida de los nematodos a) *Ascaris lumbricoides*; b) *Toxocara Cati* y *T. canis*

1.2. Los huevos de los helmintos

Los huevos son estructuras extremadamente resistentes a diversos factores ambientales como temperatura, pH, sequedad, cierto tipo de contaminantes (detergentes, insecticidas, metales tóxicos y sustancias nocivas (Jiménez *et al.*, 2010). Esto es básicamente por las capas de diferente composición química, que conforman a los huevos de los helmintos, siendo tres: una interna de lípidos, otra intermedia de quitina y una externa de proteínas; que le confieren funciones de extrema impermeabilidad para asegurar una baja tasa de pérdida de agua, cuando los huevos son expuestos a desecación; al ataque de agentes químicos y/o al estrés mecánico

(Wharton, 1983; Jiménez y Maya, 2007). Los huevos de helmintos presentan resistencia al ambiente debido a su metabolismo con altas cantidades de triglicéridos e hidratos de carbono (Dmitryjuk et al., 2006). Las capas internas de los huevos, sus formas y tamaños, se pueden diferenciar dependiendo del grupo al que pertenezca el helminto; llegando a medir entre 20 a 90 μm y presentando una densidad de 1.06 a 1.24 g/cm^3 (Jiménez et al., 2001).

La alta ovoposición, es decir la cantidad de deposición de huevos generados por una hembra adulta, varía en función al género del helminto. En la Tabla 1 se muestran las formas de los huevos y la capacidad de ovoposición de diferentes especies de helmintos.

Tabla 1. Cantidad y características de huevos generados por algunas especies de helmintos (Ellis et al., 1993).

<i>Nemátodos</i>	<i>Forma</i>	<i>Capacidad de ovoposición</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Elíptico	200 000 a 240 000
<i>Trichuris trichiura</i>	Ovoide	3 000 a 10 000
<i>Toxocara canis</i>	Esférico	200 000
<i>Hymenolepis</i> sp.	Esférico	100 000
<i>Taenia</i> sp.	Esférico	700 000

1.3. Enfermedades ocasionadas por la ingesta de huevos de helmintos

Los helmintos provocan enfermedades denominadas helmintosis y su denominación, así como sintomatología dependerá del género que la ocasione (Tabla 2). La infección se inicia cuando un huevo (o en ocasiones la larva) es ingerido al consumir agua y/o alimentos contaminados. El sector de la población más afectado niños menores de cinco años, que al ser infectados sufren deterioro físico, nutricional y cognitivo (OMS, 2012).

Tabla 2. Principales enfermedades transmitidas por helmintos (modificada de Hernández, 2009).

<i>Helminto</i>	<i>Enfermedad producida</i>	<i>Síntomas</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariosis	Disturbios abdominales y nutricionales, dolor abdominal, vómito, inquietud, síntomas neurológicos.
<i>Toxocara cati</i>	Larva migrans visceral y cutánea	Fiebre, disconformidad abdominal, dolores musculares, síntomas neurológicos
<i>Trichuris trichiura</i>	Trichuriasis	Dolor abdominal, erosión de la mucosa intestinal y pérdida de peso.
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosomiasis	Diarrea sanguinolenta y obstrucción intestinal
<i>Hymenolepis nana</i>	Hymenolepiosis	Enteritis, diarrea dolor abdominal y vómito
<i>Taenia spp</i>	Teniosis	Nerviosismo, insomnio, anorexia, disturbios digestivos, dolor abdominal y diarrea.

Tan solo en el continente americano, cerca del 30% de la población esta parasitada por lombrices, tricocéfalos y/o uncinarias (Flisser y Pérez, 2006). Estas infecciones son frecuentes en comunidades rurales de países en vías desarrollo. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE, 2005), registra 173 414 y 393 casos de ascariosis y taeniosis, respectivamente; para otras helmintosis tales como himenolepiosis, toxocariosis y trichuriasis se reportan 400,759 casos (Hernández, 2009).

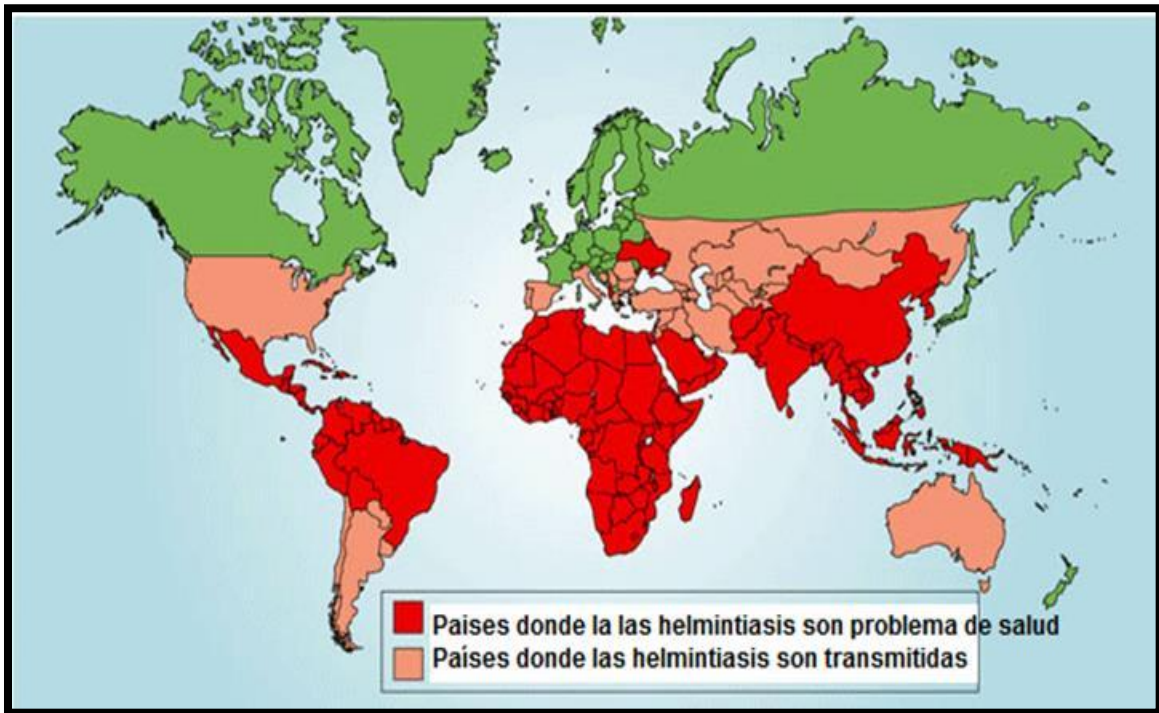


Fig 6. Países con helmintiosis (Fuente: Unidos para Combatir Enfermedades Tropicales unitingtocombatntds.org)

1.4. Métodos para identificar y cuantificar huevos de helmintos en muestras ambientales.

En la actualidad existen métodos sencillos como la tinción con colorantes sobre la muestra y avanzados como la separación por pesos para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos. Los sencillos, aunque más económicos, presentan limitantes en cuanto al volumen de muestra por procesar, mientras que por su parte los avanzados, si bien, permiten utilizar un mayor volumen de muestra, requieren equipo especializado, siendo el costo su principal desventaja. Sin embargo, y sin importar el tipo de método que se utilice, todos comprenden tres principios fundamentales: separación, extracción e identificación de los huevos, por conteo al microscopio. Esta última etapa es de relevancia primordial, ya que requiere de un mayor tiempo de análisis (hasta días) y la confiabilidad de los resultados está sujeta a un personal entrenado y capaz de diferenciar las pequeñas variaciones morfológicas

que existen entre los diversos géneros y la materia orgánica o detritus aún presente en el sedimento al momento de su observación al microscopio y etapa final de la técnica norma (NXM-AA-SEMARNAT-1999).

1.4.1. Estudios previos. Sistemas digitales para el procesamiento de imágenes.

Los sistemas de clasificación son modelos que, al suministrarles datos, realizan un adecuamiento para clasificar y establecer valores a las imágenes de los organismos y así poder definir un conjunto de parámetros característicos, para distinguirlos y diferenciarlos unos de otros a través de sus estructuras. Debido a ello, estos sistemas constituyen una alternativa para el conteo de huevos de helmintos en matrices ambientales, como el agua residual. La ventaja de que estos métodos estén automatizados los hace objetivos y confiables. Actualmente existen algunas propuestas para la detección de huevos de helmintos en forma automatizada pero éstas se enfocan a muestras clínicas o de Atlas de referencia médico, es decir a muestras en donde hay una baja probabilidad de error (Dauguschies et al., 1999; Joachim *et al.*, 1999; Sommer, 1996; Sommer, 1998a; Sommer, 1998b). A continuación se describen algunas de las metodologías más recientes utilizadas para clasificar imágenes de seres vivos revisadas en la literatura.

- a) Ciesielski y Spicer (1994) caracterizaron el crecimiento bacteriano a través de fotografías, donde los organismos eran posicionados en diferentes direcciones, para así recolectar información de sus estructuras.

- b) Álvarez *et al.* (2001) y Danckaert *et al.* (2002) propusieron técnicas para identificar imágenes de microorganismos. Los primeros trabajaron con diatomeas², basándose en el escalamiento de grises, es decir darle diversas tonalidades a la imagen y en la división la misma en segmentos. Los segundos automatizaron un proceso para identificar células neuroendócrinas y epiteliales.

² Diatomeas: Son organismos unicelulares muy abundantes en casi todos los hábitats acuáticos

- c) El sistema se basa en un banco de imágenes usado para identificar ciertos organelos a través de una red entrenada.
- d) Friedman (1997) diseñó los clasificadores Bayesianos o de imágenes, elementos que proporcionan información etiquetada a la salida, a partir de un conjunto de características tomadas como entradas y estas se manejan como formulaciones de sucesos en términos de variables aleatorias (Fig. 7). En el clasificador Bayesiano cada nodo representa una variable y cada arco una dependencia. Los clasificadores Bayesianos, se han usado de igual manera para la identificación de seres microscópicos.

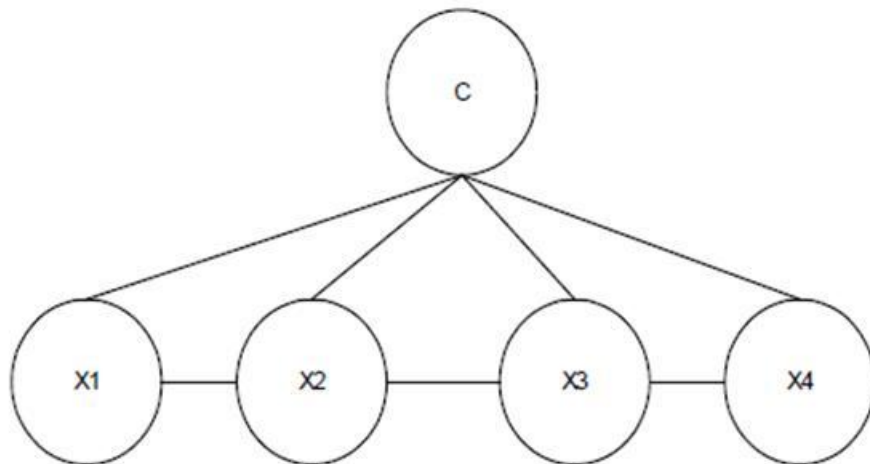


Fig. 7 Estructura de un Clasificador Bayes, en la cual se observa la entrada de datos(c) y su interacción entre las variables propuestas (x1, x2, x3 y x4).

- e) Arámbula *et al.* (2005) llevaron a cabo la aplicación de los clasificadores Bayesianos para la identificación de células y microorganismos, para lo cual desarrollaron un conteo automático de células utilizando bancos de imágenes para entrenar al sistema. En la Fig. 8 se muestran las imágenes en tonos grises sometidas a un clasificador Bayesiano para diferenciar los pixeles positivos de los negativos.

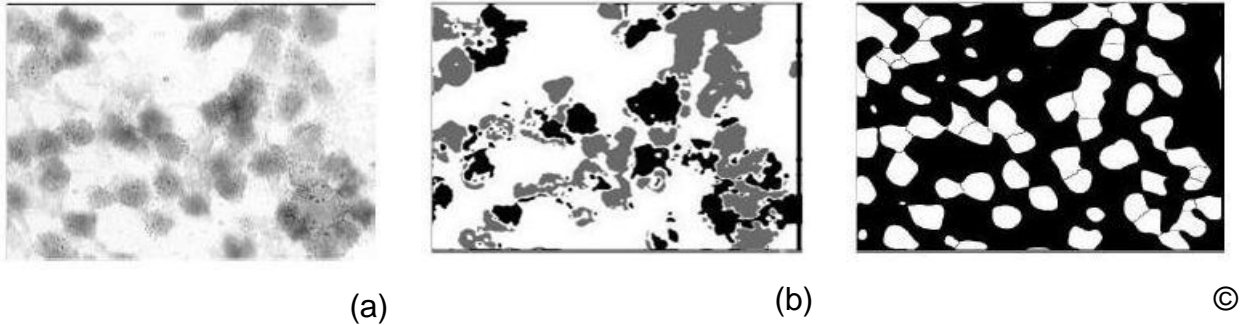


Fig.8 Imagen de células procesadas con escalamiento en grises (a); Imagen con segmentación de píxeles positivos y negativos por el método de Bayes, (b). Imagen con procesos de filtrado LoG, (c) umbralización, método de vertientes y filtrado del campo de distancia (Arámbula *et al.*, 2005).

e) Castañón *et al.* (2006) describieron un método automatizado para identificar quistes de una especie de protozoario (*Coccidia sp.*) usando imágenes digitales con el clasificador. En este caso tomaron en cuenta el tamaño, la curvatura, la geometría, la textura, la estructura interna y las variaciones morfológicas del microorganismo. Dado que dicho proceso es uno de los más completos permite extenderlo hacia otras especies de protozoarios y hacia huevos de helmintos (Fig. 9).

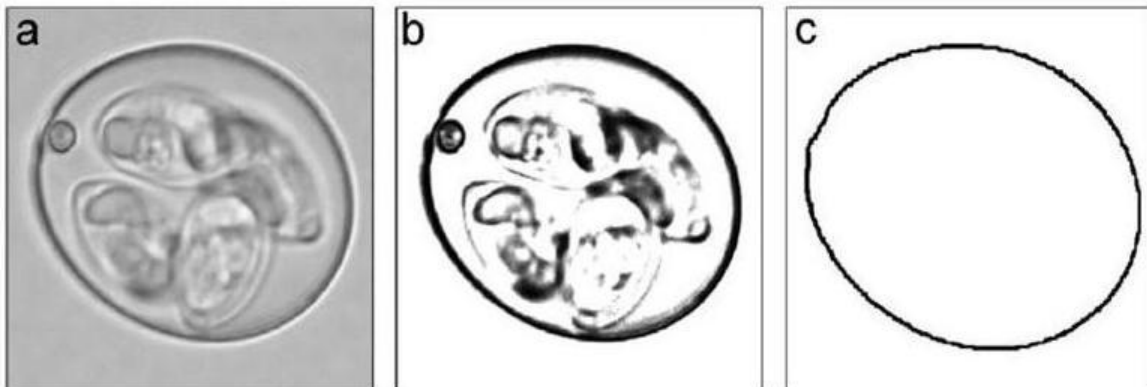


Fig. 9 Etapas del procesamiento del quiste de protozoario. a) Escala de grises; b) Binarización; c) Detección del contorno (Castañón *et al.*, 2006).

f) Ates y Gerek (2009), para realizar el conteo de colonias bacterianas, en donde las células de los organismos se encuentran más cercanas, llegando en ocasiones al solapamiento, implementaron un sistema en cajas Petri a partir

g) de las cuales obtenía la imagen en escala de grises eliminando la dispersión visual, logrando establecer el umbral de detección para las estructuras. En la Figura 10 se muestran las colonias bacterianas en las cajas Petri con su proceso de transformación.

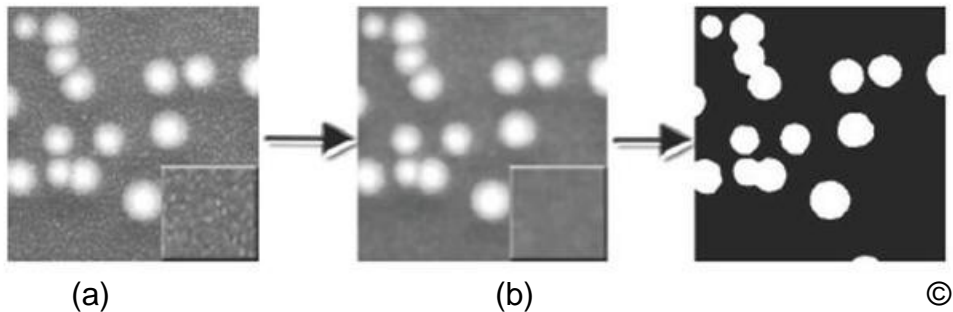


Fig. 10. Proceso de transformación de la imagen por escala de grises (a); la eliminación de la dispersión (b); y ya establecido el umbral de detección (c). Después de esto sigue el conteo de las colonias de bacterianas.

Algunos otros estudios de identificación celular son:

h) Young *et al.* (1995), propusieron un sistema para determinar en forma automática la biomasa algal.

i) Ranefall *et al.* (1998), cuantificaron automáticamente núcleos celulares a partir del color (Fig. 11 y 12).

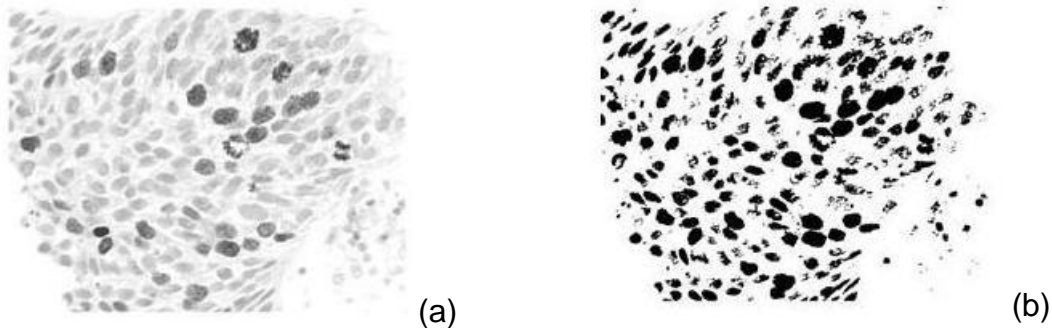
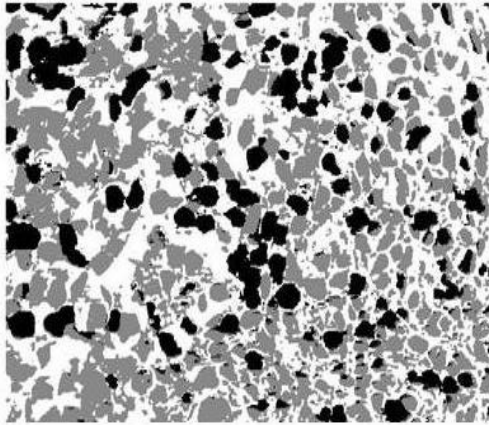


Fig. 11. (a) Imagen de células por inmunohistoquímica (b) umbral de detección (Ranefall *et al.*, 1998).



```

FOR i:=0 TO 255
  area[i]:=0;
  perimeter[i]:=0;
END FOR
FOR y:=0 TO YMAX
  FOR x:=0 TO XMAX
    this:=f(x,y);
    right:=f(x+1,y);
    down:=f(x,y+1);
    area[this]:=area[this]+1;
    IF this<right THEN
      perimeter[this]:=perimeter[this]+1;
      perimeter[right]:=perimeter[right]-1;
    ELSE
      IF this>right THEN
        perimeter[this]:=perimeter[this]-1;
        perimeter[right]:=perimeter[right]+1;
      END IF
    END IF
  END FOR
END FOR

```

(a)

(b)

Fig. 12. (a) Imagen de células cuando son positivas (negras) o negativas (grises) a tener núcleo. (b) inicio del pseudo-código computacional para detectar umbrales en las imágenes (Ranefall *et al.*, 1998).

- j) Kreitz *et al.* (1995), mencionan que la automatización del análisis de imágenes es útil cuando hay poca cantidad de partículas, por lo que no resulta confiable para muestras de agua residual, y se debe realizar un tratamiento eficaz para eliminar los contenidos del fondo que pudiesen generar ruido en la imagen.

1.4.2. Sistemas digitales para huevos de helmintos

A continuación se describen métodos específicos para huevos de helmintos:

- a) Yang *et al.* (2001), realizaron el primer estudio en donde se detectan los huevos de helmintos en muestras clínicas (Fig. 13). Este método emplea un algoritmo computacional con las imágenes digitales procesadas a través de redes y clasificadores, seleccionando ciertas características morfométricas basadas en forma y tamaño. Los sistemas de clasificación son sistemas compuestos por un gran número de elementos básicos y son entrenados para reaccionar de una manera deseada ante los estímulos y variables de datos ingresados al sistema.

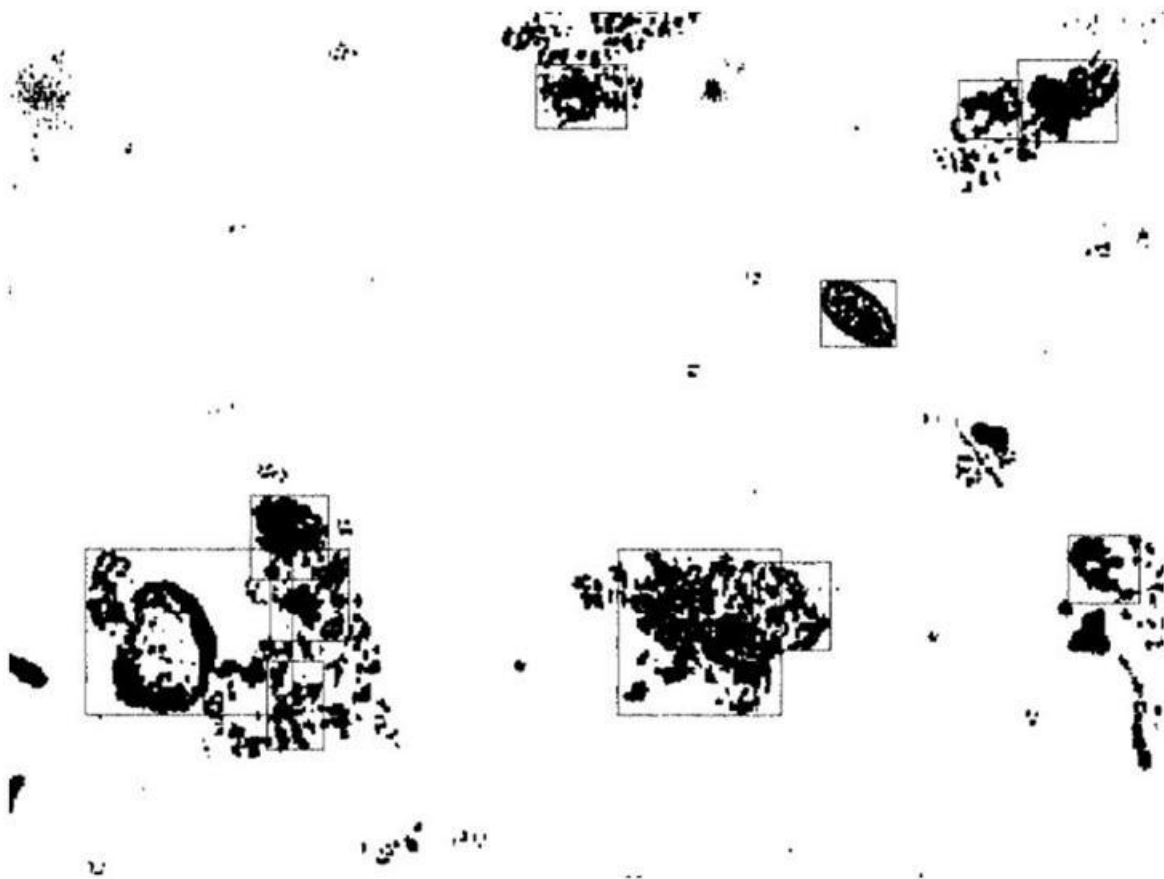


Fig. 13 Identificación digital de la imagen por Yang *et al.* (2001). Muestra diferencias de identificación entre helmintos y basura del fondo en la imagen.

b) Acvi y Varol (2009), trabajaron con seis especies de helmintos utilizando un diagnóstico para el sistema de clasificación basado en características morfométricas de los huevos (longitud, textura y forma), obteniendo 97.70% de éxito y basándose en los valores de constantes de error y tolerancia. La metodología utilizada constó de cuatro pasos: a) pre-procesamiento, donde se llevan a cabo las etapas de reducción del ruido, aumento del contraste y umbralización; b) extracción donde se emplea el método de los momentos invariantes, siendo las medias, varianzas, asimetrías y curtosis de la distribución, usando ciertos momentos de la imagen (Flusser, 2000), c) clasificación y d) prueba (Fig. 14).

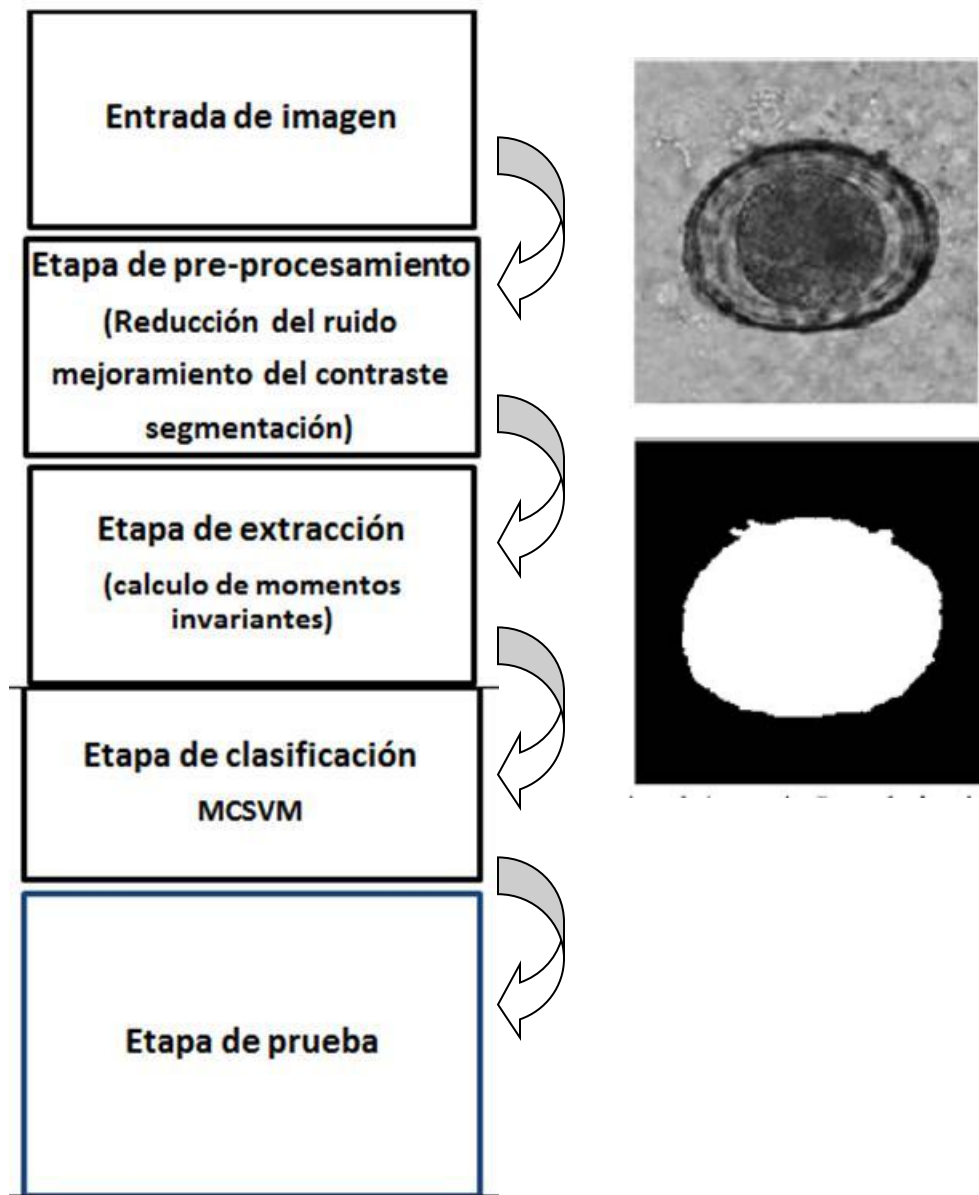


Fig. 14. Huevo fértil de *Ascaris lumbricoides* antes y después del pre-procesamiento.

(Acvi, 2009).

- c) Dogantekin *et al.* (2008), clasificaron 16 especies de huevos de helmintos utilizando momentos invariantes adaptados a un sistema de inferencia (Figs.15-17). Los momentos invariantes se han convertido en una herramienta básica para el reconocimiento de objetos desde hace 30 años (Flusser, 2000).

Esta técnica se basa en el escalamiento, traslación y rotación de las figuras por estudiar (Xu, 2008). En la práctica, se aplica un pre-procesamiento, los momentos invariantes y la inferencia del sistema. Las simulaciones se hacen usando MATLAB. La correcta clasificación por este método es mayor al 90% en todos los tipos de huevos estudiados.

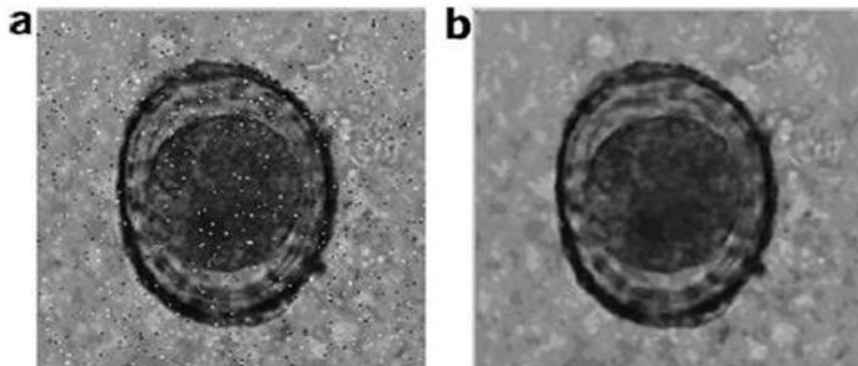


Fig. 15 Proceso de identificación de *Ascaris* por el método de Dogantekin *et al.* (2008) a) *Ascaris lumbricoides* normal b) *A. lumbricoides* con filtrado.

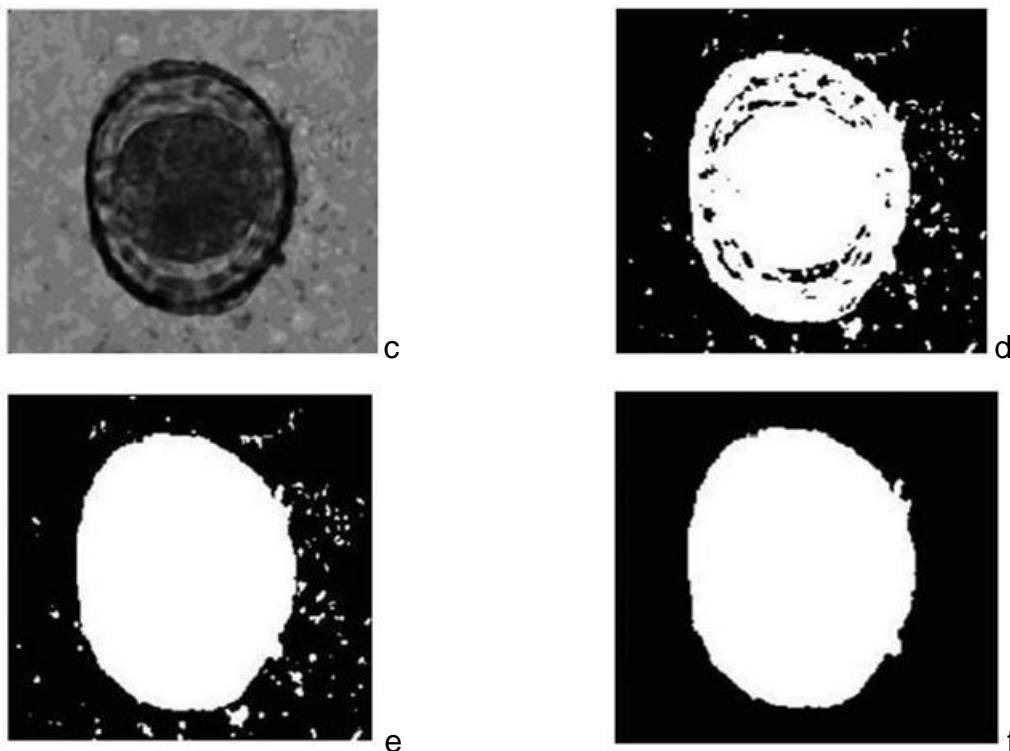


Fig. 16 Proceso de identificación de *Ascaris* por el método de Dogantekin *et al.* (2008) c) *A. lumbricoides* contraste d) binarización e) llenado de espacios f) después del proceso de erosión

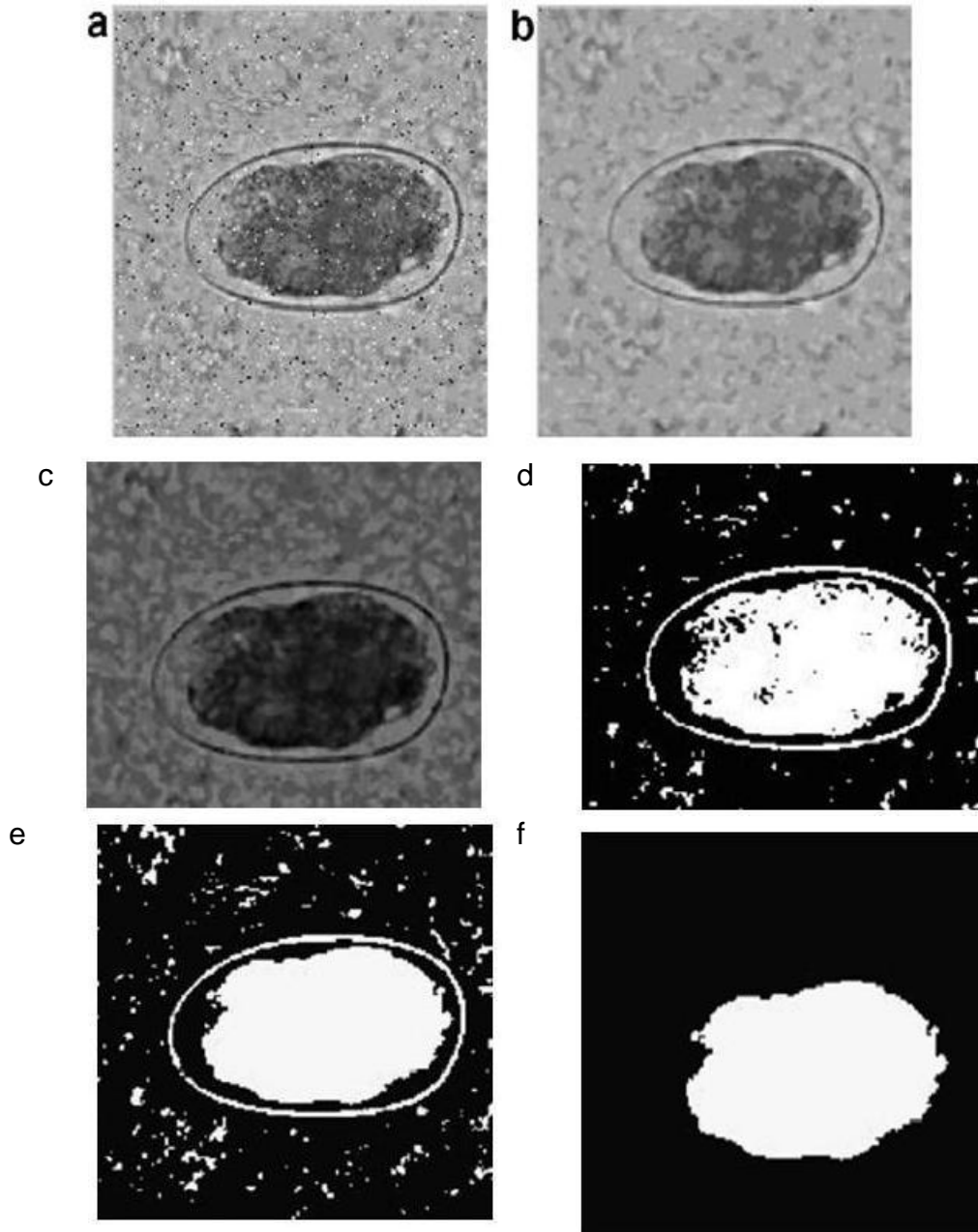


Fig. 17 Proceso de identificación por Dogantekin *et al.* (2008) a) Huevo de helminto normal b) huevo de helminto con filtrado c) en contraste d) binarización e) llenado de espacios f) después del proceso de erosión. Otros helmintos después del tratamiento (Ver Anexo 1).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el uso de agua residual en países en desarrollo está encausada para fines agrícolas y a que las técnicas de identificación y cuantificación de los huevos de helmintos son complejas (en costo y tiempo de análisis), el presente trabajo de tesis propuso el desarrollo de un algoritmo basado en el reconocimiento automático de imágenes para eliminar dicha problemática.

Debido a que la mayor parte de los estudios se llevaron a cabo con muestras clínicas y no con muestras ambientales, el presente estudio representa un mayor reto para el diseño del sistema ya que hay muchas fuentes de error.

Si bien, la aplicación de este tipo de sistemas y los clasificadores han permitido la identificación de algunas especies de huevos de helmintos de importancia clínica, el presente trabajo tuvo como objetivo principal el establecer un sistema que permitiera identificar y cuantificar las especies de importancia clínica, con cierta prevalencia en el ambiente y distribución mundial.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar las bases para la generación de un programa de cómputo que permita el reconocimiento y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de agua residuales.

3.1 Objetivos particulares

- Comparar diferentes metodologías para el procesamiento de imágenes, adaptables a la identificación de huevos de helmintos y seleccionar una apropiada a los fines del presente estudio.
- d) Elaborar un archivo fotográfico base para seleccionar las especies y sus características adecuadas para poder diferenciarlos de otras especies y clasificarlos. .

- Llevar a cabo el manejo de la técnica norma para agua (NMX-AA-113-SCFI-2012) para obtener los huevos de helmintos deseados y además comparar esta técnica frente al software desarrollado.
- Caracterizar siete especies de huevos de helmintos: 1) *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), 2) *Hymenolepis nana*, 3) *H. diminuta*, 4) *Schistosoma mansoni*, 5) *Taenia* sp., 6) *Toxocara canis* y 7) *Trichuris trichiura*) por sus formas y tamaños, para el desarrollo de un programa de cómputo para la identificación y cuantificación automática de los mismos.
- Validar el programa de computo *versus* la técnica NMX-AA-113-SCFI-2012, con tres diferentes calidades de agua residual.

ALCANCES

Desarrollo de una a base de datos para el análisis de matrices de agua residual para las siguientes especies de huevos de helmintos: *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris trichiura*. Estas especies fueron elegidas debido a la variedad de formas, tamaños e importancia ambiental que representan.

Proporcionar datos gráficos de estas especies que permitan identificar las características de interés.

HIPÓTESIS

Los sistemas de reconocimiento de imágenes son capaces de identificar y cuantificar diferentes especies de huevos de helmintos, de manera automática en matrices de agua residual de diferentes calidades, con al menos la misma eficiencia que el método de la técnica norma tradicional.

4. METODOLOGÍA

La metodología empleada en el presente trabajo constó de cinco etapas, mismas que se detallan a continuación:

4.1 Comparación bibliográfica de los métodos de procesamiento de imágenes.

Se llevó a cabo la revisión bibliográfica a nivel internacional de diversos sistemas utilizados para identificar y/o cuantificar especímenes biológicos, así como diversos tipos de células. Para su comparación se tomaron en cuenta, tanto ventajas como desventajas al respecto del tipo de imágenes que clasifican, tipo de procesamiento, capacidad de personal para realizar la identificación, tipo de programa, etc. Con esta información se procedió a elegir el sistema que presentara las condiciones que permitieran mejor procesar las imágenes digitales de diferentes especies de huevos de helmintos.

4.2. Generación de archivo fotográfico y selección de especies

Se elaboró un archivo fotográfico de huevos de helmintos de las especies seleccionadas, el cual incluyó una amplia variedad de características de los huevos, tales como forma, tamaño, largo, ancho, diámetro, borde, color, etc., así como imágenes con alta y baja carga de detritus para simular diferentes condiciones de lectura al microscopio de muestras ambientales. Para el acopio y selección de fotografías se utilizó el acervo del Grupo de Tratamiento y Reúso (GTR, IINGEN, UNAM), fuentes bibliográficas (como catálogos y atlas internacionales), centros de investigación parasitológicos, tanto dentro como fuera de la UNAM, así como la toma de nuevas fotos, en el laboratorio de parasitología del Instituto de Ingeniería, de aquellas especies de huevos faltantes para completar el archivo. Para la toma de fotografías se emplearon una cámara Cámara Nikon, modelo Coolpix 990 para microfotografía y una Cámara UI-148LE-C, adaptadas a un microscopio óptico Axio Lab A1, Carl Zeiss, utilizando ajustes fijos de iluminación.

El archivo fotográfico se conformó con el apoyo de diversos centros de estudios parasitológicos (Centro Médico Nacional Siglo XXI, Unidad de Medicina Experimental (UME), laboratorio de Inmunoparasitología; en el Instituto de Biología, UNAM (IBUNAM), así como con ayuda del Dr. František Moravec (Instituto de Parasitología de la Academia de Ciencias de la República Checa). El archivo sirvió como base para la selección de las diferentes especies de huevos de helmintos a utilizar para entrenar el sistema (se tomó en cuenta importancia médica, prevalencia en el ambiente y distribución mundial) e iniciar así la aplicación de la técnica de procesamiento de imágenes digitales. Las especies seleccionadas fueron *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris trichiura*, por su importancia médica en países en desarrollo como México.

4.2.1 Manejo de la técnica tradicional para conteo de huevos de helmintos y generación de imágenes.

Para el manejo de la técnica norma NMX-AA-113-SCFI-2012 (Anexo 2), desarrollada en el laboratorio de parasitología del Instituto de Ingeniería, UNAM, se utilizaron muestras de agua residual de las plantas de tratamiento de aguas residuales de San Pedro Actopan, ubicada en la delegación Milpa Alta, D.F., y de la de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, ubicada en la delegación Iztapalapa, D.F. El agua residual de ambas plantas es tipo municipal/doméstico y contienen diversa cantidad y variedad de especies de huevos de helmintos (Barrios, 2003; Jiménez et al., 2010) y considerando influentes y efluentes representan diversas calidades.

El método empleado para la recuperación de los huevos de helmintos incluyó la técnica de concentración donde las partículas de interés permanecen en la superficie de una solución saturada (por ejemplo, $ZnSO_4$), cuya densidad utilizada, mayor que la de los huevos (1.3 gramos), permite la flotación de los tres grupos de helmintos considerados

en el presente estudio. Y por otro lado, la misma técnica emplea la combinación de dos reactivos no miscibles entre sí, donde las partículas se orientan en función de su balance hidrofílico-lipofílico. La identificación y cuantificación de los huevos se realizó a través de un barrido total en

una cámara de conteo DonCaster o de una celda de conteo Sedgwich-Rafter, utilizando un microscopio óptico (Axio Lab A1, Carl Zeiss (Fig. 18). Los resultados se expresan en número de huevos por litro (HH/L). También, se contó con concentrados de diversas especies adquiridas del laboratorio COPROTEC (Fig. 19) y utilizados para complementar el archivo fotográfico, así como un concentrado de huevos de la especie de *Schistosoma mansoni*, donados por el laboratorio de la Dra. Clélia Christina Mello-Silva del Instituto Oswaldo Cruz en Brasil y poder contar con una especie característica de otras regiones a nivel mundial (Asia, África, América del Sur) e incluirlo para la evaluación de sistema generado.

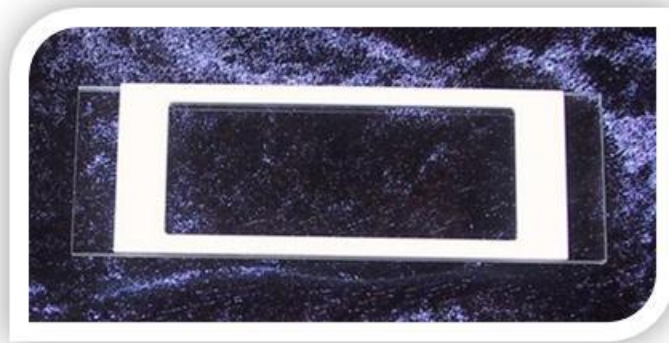


Fig.18 Celda de Sedgwich-Rafter para cuantificación de huevos de helmintos.



Fig. 19 Concentrados 3000h/mL de un total de 4 mL de muestra por especie de huevo de helmintos.

4.4. Procesamiento de imágenes

El procesamiento estandarizado de las imágenes fue necesario para poder entrenar el programa y crear el algoritmo. Para ello, se establecieron las características discriminativas, tales como: D= diámetro, L= longitud y W= ancho

Las imágenes capturadas se respaldaron en un archivo bajo las siglas establecidas para cada especie de huevo de helminto y se dividieron en cuatro grupos de acuerdo con el objetivo utilizado (seco débil 100 aumentos y seco fuerte 400 aumentos) y resolución de la cámara (Fig. 20). Las del grupo uno fueron pequeñas para ser diferenciadas y procesadas por lo que fueron descartadas. Las correspondientes a los grupos dos y tres presentaron dimensiones similares entre sí, mayores a las del primero, pero menores a las del grupo cuatro, que ocupó todo el campo de visión. Las imágenes seleccionadas correspondieron a las del grupo dos, logrando así un buen aumento y amplia visión del campo ya que las del grupo tres se concentraban en el huevo del helminto y no en la basura de alrededor. Finalmente, se procesaron las imágenes con el programa MATLAB. Todo el software de procesamiento y análisis de imágenes digitales fue desarrollado en colaboración con el Laboratorio de Imagenología Biomédica del CCADET, UNAM.



Fig. 20 Grupos de características para la toma de imágenes

Para lograr el desarrollo del sistema de identificación se llevó a cabo el análisis de diversas características (área, perímetro, eje mayor, menor, excentricidad, etc.), para diferenciar entre cada una de las especies seleccionadas de helmintos. En una primera fase se seleccionaron características como la compacidad, textura, energía, contraste, etc. de los huevos de helmintos, con las cuales se calcularon las medidas: A partir de ello, se podrán observar errores en el sistema a ser corregidos.

Las imágenes fueron sometidas a un algoritmo de procesamiento (Fig. 21), tomando diez de las mejores imágenes por especie de huevo de helminto para ello. Se consideró únicamente este número ya que con el algoritmo ocupado, las clases o especies de helmintos se consideran equiprobables, por lo que se cuenta con la misma posibilidad de que aparezca una u otra de las especies, esto basado conforme al teorema de Bayes, en donde el cálculo de sus probabilidades subjetivas se basa en la ocurrencia de los siguientes eventos:

- a) Capturar imagen.
- b) Conversión a escala de grises
- c) Filtrado anisotrópico, el cual mejora la textura de la superficie y los bordes de un objeto.
- d) Ajuste de contraste de la imagen mediante la ecualización del histograma.
- e) Binarización de la imagen por método de Otsu³, el cual se emplea cuando hay una clara diferencia entre los objetos a extraer respecto del fondo de la escena.

³ Método de Otsu: se basa en la umbralización que es una técnica de segmentación ampliamente utilizada en las aplicaciones industriales. Se emplea cuando hay una clara diferencia entre los objetos a extraer respecto del fondo de la escena

Al aplicar un umbral (T) a la imagen en escala de grises ($f(x,y)$), quedará binarizada; etiquetando con '1' los píxeles correspondientes al objeto y con '0' aquellos que son del fondo. Por ejemplo, si los objetos son claros respecto del fondo, se aplicará

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \leftrightarrow f(x,y) > T \\ 0 & \leftrightarrow f(x,y) \leq T \end{cases} \quad n(1)$$

En el caso de que los objetos sean oscuros respecto del fondo, la asignación sería a la inversa:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \leftrightarrow f(x,y) < T \\ 0 & \leftrightarrow f(x,y) \geq T \end{cases} \quad n(2)$$

Si bien, hay diferentes métodos para hallar un umbral, la mayoría de ellos no proporcionan buenos resultados cuando se trabaja con imágenes de muestras debido a la presencia de ruido o una iluminación inadecuada. Sin embargo, el método de Otsu

fue uno de los mejores métodos de selección de umbral para imágenes del mundo real (UNAQ, 2005).

f) Relleno de espacios en los objetos de la imagen mediante operaciones morfológicas, en donde se eliminan los objetos pequeños.

h) etiquetado de los objetos por medio de una transformada de vertientes, utilizando el algoritmo de *Watershed*, el que segmenta a las imágenes de acuerdo con su morfología matemática; por lo que las menores a determinado tamaño, no son consideradas huevos de helmintos y son eliminadas (Roerdink y Meijster, 2001).

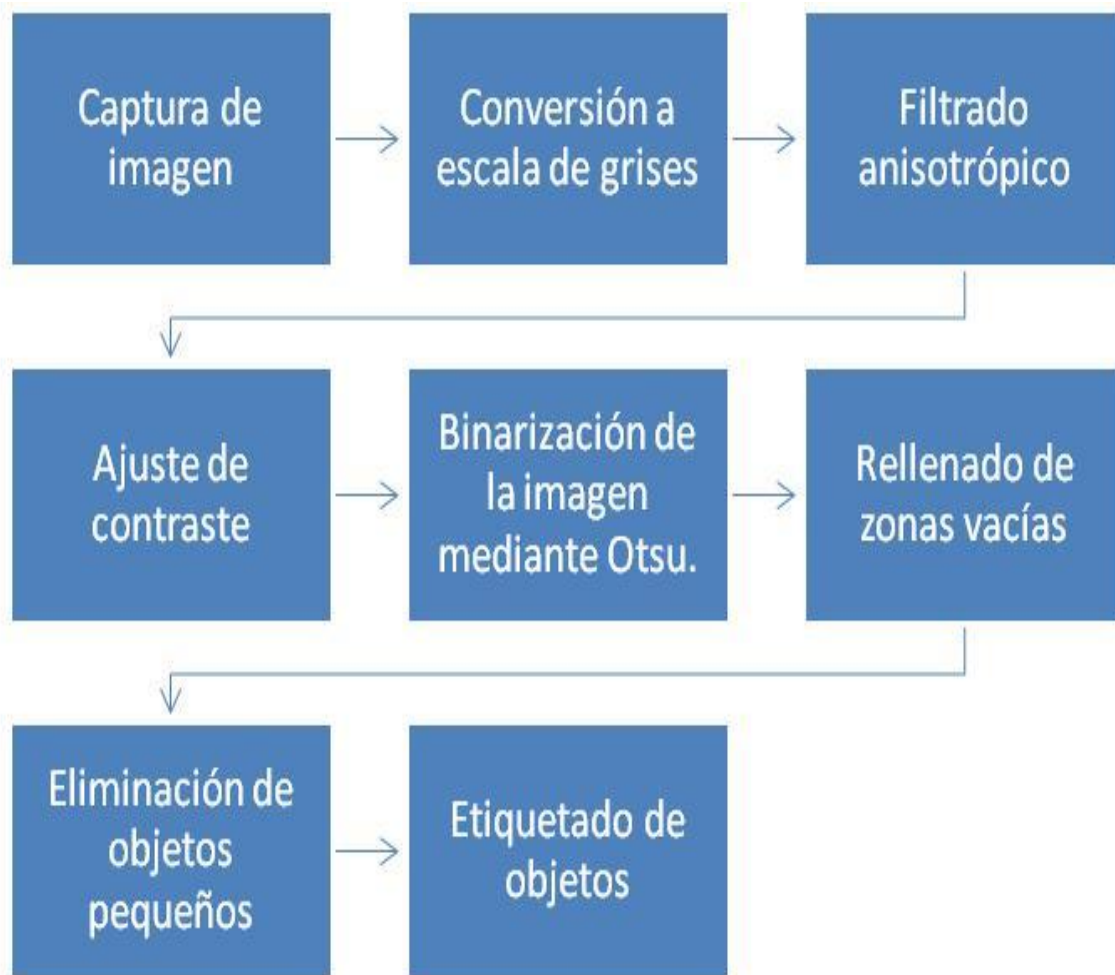


Fig. 21 Algoritmo de procesamiento de las imágenes

Una mejora desarrollada y aplicada posteriormente al algoritmo de procesamiento de la imagen, consistió en suavizar las regiones delimitadas por los bordes, pero conservándolos; este cambio se realizó con el uso del filtro (anisotrópico), el cual utiliza ecuaciones de las derivadas parciales para reducir el ruido. Perona y Malik (2002) han propuesto este modelo con el fin de mejorar las imágenes con ruido, como es el caso del agua residual que contiene a los huevos de helmintos y una gran cantidad de detritus.

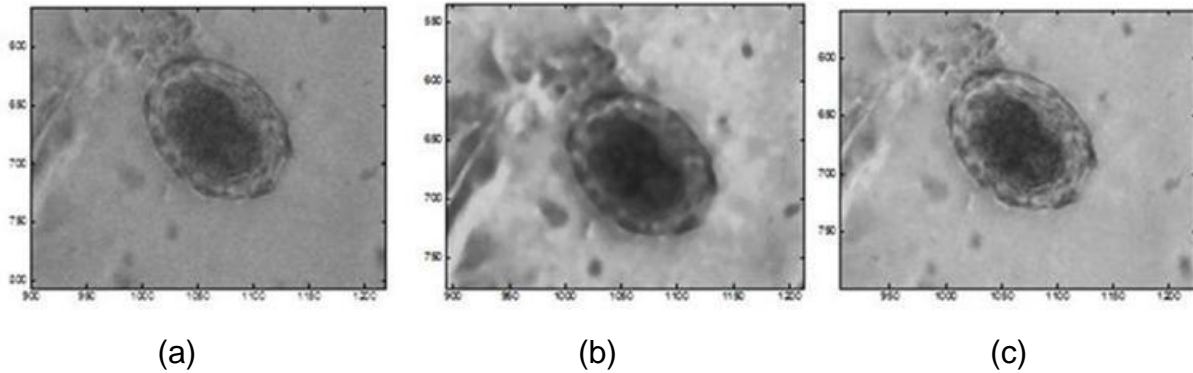


Fig 22. Comparación de filtros (a) Imagen original, (b) Filtro de mediana utilizado previamente, y (c) filtro de difusión anisotrópica

La segmentación de las imágenes de los huevos de helmintos se mejoró mediante un proceso de binarización con el 80% del valor propuesto por el método de Otsu. Este método aplica la umbralización, técnica de segmentación ampliamente empleada cuando hay una clara diferencia entre los objetos a extraer respecto del fondo de la escena. Los principios que rigen son la similitud entre los píxeles pertenecientes a un objeto y sus diferencias respecto al resto. Por tanto, la escena debe caracterizarse por un fondo uniforme y por objetos parecidos. Al aplicar un umbral T , la imagen en escala de grises $f(x, y)$, quedará binarizada; etiquetando con '1' los píxeles correspondientes al objeto y con '0' aquellos que son del fondo. Por ejemplo, si los objetos son claros respecto del fondo, se aplicará:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \Leftrightarrow f(x,y) > T \\ 0 & \Leftrightarrow f(x,y) \leq T \end{cases} \quad (3)$$

Una vez procesadas las imágenes se inició el desarrollo del sistema de detección para la clasificación de los huevos de helmintos a través de un clasificador bayesiano. Inicialmente se probaron cuatro de las especies seleccionadas, las cuales fueron: *Ascaris lumbricoides* infértil y fértil, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Tichuris trichiura*. Para la elección de las características básicas de clasificación, se realizó una distribución normal y sólo aquellas que poseían frecuencias distintas, es decir que no se superponían, fueron seleccionadas:

a) Área y diámetro

Para estimar el área de la figura circular u ovalada pero irregular de los huevos de helmintos, se aplicó un modelo a través de una dimensión fractal utilizando los pixeles de las imágenes. Un pixel es un elemento lógico de la imagen digital y además de poseer factores de escala, tiene asociada un área unitaria, cuya unidad mínima de perímetro es uno de sus lados, implicando a ello se obtiene un esquema de conectividad (proximidad espacial entre pixeles de una imagen).

La evaluación del diámetro requirió en primera instancia establecer la conectividad que guardan los pixeles que componen a la imagen, conocer el número de lados que tienen los pixeles del borde del objeto, determinar la distancia entre los centros de tales pixeles y de rugosidad del perímetro o prueba de reconocimiento.

b) Excentricidad

La excentricidad mide el mayor o menor achatamiento de una elipse. Es la relación de la distancia de cualquier punto de la curva desde el foco hasta la distancia de ese punto desde la directriz (una línea fija). El círculo tiene una excentricidad de cero; una elipse tiene una excentricidad de menos de uno; una parábola tiene una excentricidad de uno; y una hipérbola tiene una excentricidad mayor de uno (Fig. 23). Esta característica puede ayudar para identificar la forma de los huevos de los helmintos debido al achatamiento que llegan a tener.

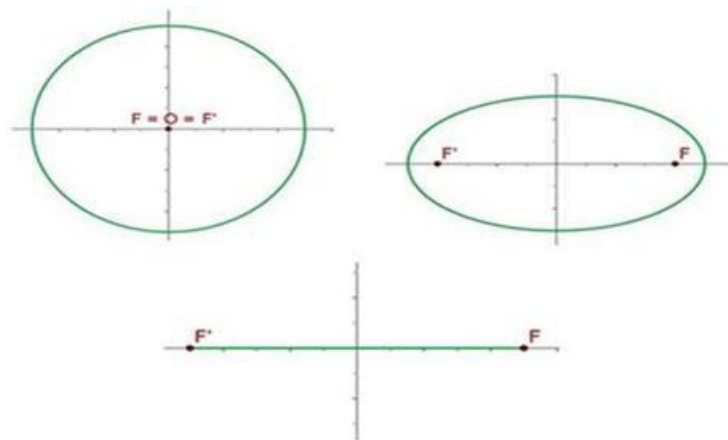


Fig. 23 Excentricidad de una elipse

c) Compacidad

La compacidad o esfericidad es la relación que guarda la longitud del perímetro (P) con el área (A). A medida que el objeto se aproxima a un círculo, su valor se acerca a uno y es menor para objetos elongados (Fig. 24). Se utiliza esta métrica de compacidad para poder evaluar de forma cuantitativa la forma del objeto, si la semejanza es menor a cierto valor (p.ej.: 30%) la estructura analizada no es clasificada como huevo de helminto.

$$\text{Compacidad} = \frac{\text{longitud_perímetro}^2}{\text{área}}$$

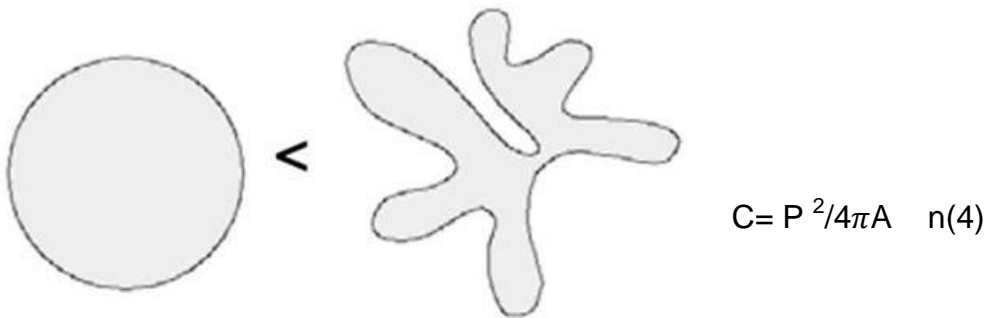


Fig. 24 Compacidad de una figura.

d) Entropía

Esta magnitud calcula el desorden interno de los huevos de los helmintos. Para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$E = \sum_i p_i \log (p_i) \quad (5)$$

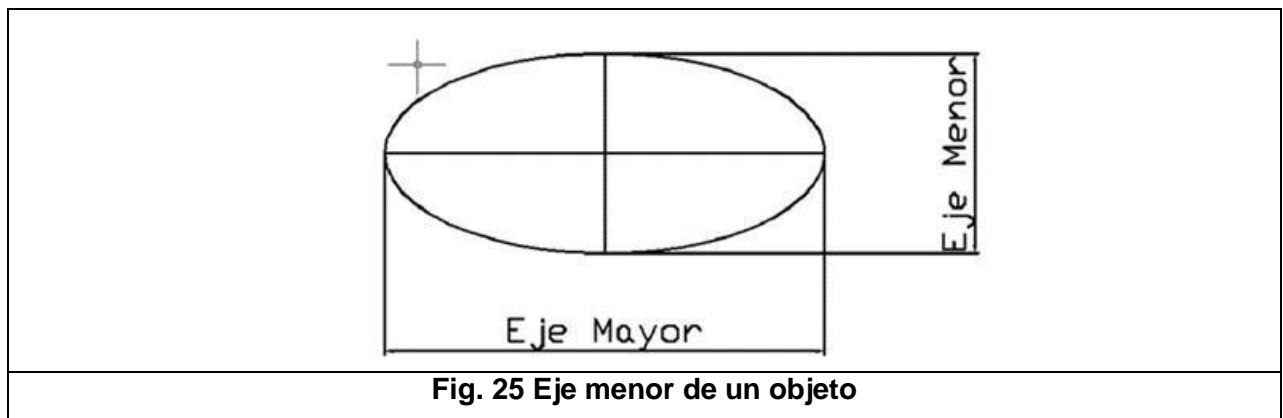
Donde p_i es la probabilidad de un valor de gris determinado, calculado a partir del histograma

e) La rugosidad del perímetro

Es la caracterización de un aspecto geométrico, curvatura de la frontera, borde o cambio angular del objeto. Lo valores obtenidos de esta característica, permitieron construir un histograma de curvaturas que proporciona una medida de la estructura de la forma del objeto o rugosidad del perímetro del mismo. Así por ejemplo, un círculo sin rugosidad en su perímetro tendría asociado un histograma de curvaturas formado por una sola barra con una desviación estándar igual a cero.

f) Eje menor y eje mayor

El eje menor es la línea que pasa a través del centro de la figura u objeto y es perpendicular al eje mayor. Esta característica se emplea para denotar el tamaño de los huevos de los helmintos, similar a la excentricidad para medir el achatamiento de la elipse. No obstante, el eje mayor también fue calculado.



4.5 Validación del algoritmo

4.5.1. Calidad del agua residual

Consistió en el muestreo y tratamiento de agua residual por la técnica NMX-AA-113-SCFI-2012). El agua se clasificó en tres tipos o calidades dependiendo de la calidad de sólidos suspendidos totales. En la Tabla 3 se muestran el intervalo de sólidos suspendidos totales (SST), considerando la cantidad de huevos de helmintos por especie y los tipos de procesos de tratamientos reportados en la literatura que generan cada calidad de agua. El agua tipo I posee de 0.5 a 0.97 mg/L de SST y es equivalente a un agua de buena calidad; el tipo II de > 40 a 150 mg/L de SST, equivalente a una calidad media a mala; la tipo III de 240 a 763 mg/L de SST, equivale a un agua residual cruda osin tratamiento. Mayores detalles de las equivalencias de las calidades se presentan en la Tabla 3. A las muestras obtenidas se les adicionaron huevos de las siete especies en estudio. El contenido promedio por 1.0 mL fue de 90 *Ascaris lumbricoides*, 115 *Trichuris trichiura*, 125 *Hymenolepis nana*, 155 *Hymenolepis diminuta*, 90 *Toxocara canis*, 100 *Taenia* sp. y 20 *Schistosoma mansoni*. Las observaciones y toma de fotos se realizaron con un microscopio óptico (Axio Lab A1, Carl Zeiss) con una cámara Cámara Nikon, modelo Coolpix 990 para microfotografía y una Cámara UI-148LE-C.

Para estandarizar la muestra en un solo plano se decidió utilizar preparaciones normales con portaobjetos y cubreobjetos y no el Sedgwich-Rafter o cámara de Doncaster. Se realizaron diversas pruebas aplicando aumentos de 100x y 400x con zoom de la cámara, hasta obtener las imágenes óptimas para el procesamiento, se les elaboró una copia, misma que fue ordenada y almacenada de acuerdo al tipo de agua para posteriormente, ser comparadas con el sistema y llevar a cabo la validación correspondiente.

Tabla 3. Caracterización de tres tipos de calidades de agua residual

Tipo de muestra	Tipo de proceso que lo generó dentro del estudio	Intervalo de SST en muestras analizadas (mg/L)	Intervalo de huevos de helmintos determinado (HH/L)	Tipo de proceso reportado en la literatura*	Intervalo de SST reportados en la literatura** (mg/L)
Tipo 1	Efluente secundario biológico + filtración	0.5 a 0.97	0.0 a <0.2	Tratamiento terciario: coagulación/floculación, filtración con arena de baja alta tasa, filtración con medio dual, membranas	< 10
	Efluente secundario fisicoquímico + filtración	1.0 a 3.0	0.0 a 1.0		
Tipo 2	Efluente secundario biológico	3 a 15	0.4 a 1.0	Tratamiento Secundario: lodos activados sedimentación secundaria, filtro percolador sedimentación secundaria, lagunas aireadas sedimentación	>10 a 150
	Efluente secundario fisicoquímico	> 15 a 40	1.2-2.0	Tratamiento Secundario: coagulación/floculación	
	Efluente Primario	>40 a 150	8.0 a 15	Procesos Biológicos de Baja Tasa: lagunas de estabilización, efluentes de almacenamiento y embalses, humedales (Wetlands) Procesos de Alta Tasa (Tratamiento Primario): sedimentación primaria convencional, Tratamiento Primario Avanzado (sedimentación ayudada químicamente), UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente)	
Tipo 3	Agua residual cruda	240 a 763	13 a 70	Agua residual cruda municipal	>150 a 1200
Porcentaje de huevos de helmintos en los diferentes tipos de muestras analizadas: A= 70 a 85%, To= 7 a 12%, Hd= 5 a 7%, Tr=4 a 6%, Hn=2 a 4%, Taenia= 0.4 a 1%					
Fuente: Metcalf & Eddy, 1991*; WHO, 2006**					

4.5.2. Especificidad y sensibilidad

Estos son parámetros utilizados para medir la funcionalidad de los clasificadores. **La sensibilidad** es la probabilidad de clasificar correctamente a un huevo de helminto, es decir la capacidad del clasificador para detectarlo. La sensibilidad varía de 0 a 1 (0 a 100%) cuanto más alto sea su valor numérico, mayor capacidad para detectar y clasificar a los huevos de los helmintos. La sensibilidad se calcula obteniendo los valores de verdaderos positivos (esto es lo que el algoritmo ha detectado como huevo y realmente lo es) sobre el mismo valor de verdaderos positivos más los falsos negativos (el huevo del helminto está presente pero no se detecta). Esto se realizó para cada tipo de muestra.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (6)$$

En donde *VP*: verdaderos positivos y *FN* falsos negativos.

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente cuando no se trata de estructuras de huevos de helminto, es decir toda aquella basura, polen, burbujas, etc. que se puedan encontrar en el agua residual. La especificidad toma valores de 0 a 1 (0 a 100%), es decir, cuanto más alto sea su valor numérico, mayor capacidad para detectar otros artefactos que no sean los huevos de los helmintos. La especificidad y sensibilidad son complementarias y se calcularon obteniendo los valores de verdaderos negativos (esto es lo que el algoritmo ha detectado como basura y realmente lo es) sobre el mismo valor de verdaderos negativos más los falsos positivos (el huevo de helminto no está presente y se clasifica como si estuviese). Esto se realizó para cada tipo de muestra.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (7)$$

En donde *VN*: verdaderos negativos y *FP*: falsos positivos

Durante cualquier proceso de diagnóstico se encuentran cuatro posibilidades:

- Verdaderos positivos (VP): el huevo de helminto está presente y se clasifica adecuadamente.
 - Falsos positivos (FP): el huevo de helminto no está presente y se clasifica como si estuviese.
 - Verdaderos negativos (VN): el huevo de helminto no está presente y se clasifica ausente.
 - Falso negativo (FN): el huevo del helminto está presente pero no se detecta.
- Esto ocurre con frecuencia.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Comparación bibliográfica de los métodos de procesamiento de imágenes

Durante la búsqueda bibliográfica realizada, se constató que en el ámbito internacional existen intentos similares para detectar y cuantificar huevos de helmintos. Sin embargo, su aplicación se orienta a muestras clínicas y no ambientales, como es este caso. Por ejemplo, Yang et al. (2001) obtuvo 84% de detección, en la diferenciación de siete diferentes especies de huevos, utilizando exclusivamente muestras de heces; en el trabajo empleó sólo tres características de clasificación, que resultan inadecuadas para muestras más complejas ya que no logra una umbralización óptima cuando los huevos a identificar se encuentran rodeados por objetos que no lo son. Otro ejemplo son los trabajos desarrollados por Acvi y Varol (2009) y Dogantekin et al. (2008) que logran un porcentaje de reconocimiento mayor al 90%; la validación se realizó con el Atlas Parasitológico de la Universidad de Kansas, cuyas imágenes con casi siempre muy limpias y sin dificultades de reconocimiento como ocurre en muestras ambientales. El algoritmo desarrollado en el presente estudio incluyó filtros y protocolos no solamente para diferenciar entre las siete especies de huevos de helmintos, sino también para distinguir estos últimos de cualquier tipo de objetos presentes en la muestra, lo que le da versatilidad para la identificación de estos parásitos en muestras ambientales.

El análisis automático de un espécimen biológico es complejo, ya que poseen estructuras que llegan a ser significativas para su clasificación; además las partículas residuales pueden impedir un correcto procesamiento, impidiendo la óptima interpretación de la imagen. En la Tabla 4 se muestra la comparación de las diferentes metodologías revisadas en la bibliografía internacional, así como sus ventajas y desventajas para generar un sistema automatizado de identificación y cuantificación adaptada a huevos de helmintos. Para la generación del sistema de procesamiento, se pueden rescatar varios aspectos a partir de las comparaciones realizadas entre los

sistemas de procesamiento de imágenes como son, el tipo de procesamiento estando implicado el mismo tipo de material biológico y el tipo de clasificador utilizado para los huevos de helmintos. Para que el algoritmo fuera funcional y tuviera ventajas frente a otros desarrollados, se acopló en tiempo real, identificando a siete especies de huevos de helmintos, ya que en otros sistemas había que generar plantillas de datos o solamente reconocían si el microorganismo se encontraba en la muestra y no se conocía de que tipo era o en algunos casos a una sola especie. Además en otros sistemas de los sistemas mencionados, se requería de la presencia de un técnico para ajustar y enfocar la muestra y así poder identificar o mejorarla mediante algún programa. La ventaja final de este algoritmo es que sea ejecutable y amigable frente al usuario al no requerir a un helmintólogo.

Tabla 4. Comparación de diferentes metodologías de procesamiento de imágenes para su aplicación en huevos de helminto.

Metodología	Descripción	Ventajas	Desventajas	Programa	Referencia
Sistema computarizado de análisis de crecimiento bacteriano.	El programa clasifica las imágenes bacterianas haciendo conteos y sugiriendo el uso de antibióticos para el paciente.	Diagnóstico en tiempo real. Identifica organismos de diversas especies. No necesita personal experto. Sugiere un tratamiento para el microorganismo encontrado.	Metodología usada en medios de cultivo.	Red neuronal	Ciesielski y Spicer (1994)
Clasificación de microorganismos (diatomeas) Red neuronal de MATLAB	A través de un programa basado en Biological Diatom Index (BDI) para clasificar automáticamente a las diatomeas.	Metodología usada en agua	Diagnóstico no en tiempo real. Identifica organismos de una especie. Requiere personal experto para rotar a los microorganismos. No contabiliza	Red neuronal de MATLAB	Álvarez et al., 2001.
Identificación automática de huevos de helmintos con redes neuronales	Identificación a través de las características morfológicas de especímenes fecales con imágenes digitales.	Diagnóstico no en tiempo real. Identifica organismos de diversas especies. No necesita personal experto (helmintólogos). Se incluyen factores como tamaño, forma, textura	Metodología para muestras clínicas (agua).	Red neuronal	Yang et al., 2001.

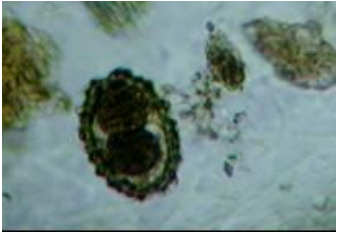


Metodología	Descripción	Ventajas	Desventajas	Programa	Referencia
Reconocimiento automático de organelos intracelulares	Se identifican organelos celulares con imágenes de microscopio confocal a través de sus proteínas.	Diagnóstico en tiempo real. No requiere personal experto. Se incluyen factores como tamaño, forma, textura.	Identifican los organelos celulares de una especie	Red neuronal	Danckaert et al., 2002.
Conteo automático inmunohistoquímico de células	Desarrollo de un sistema automático para detectar color y segmentación de las células.	Se identifican células de tejido. Se necesita personal experto para validar la prueba todo el tiempo.	No es en tiempo real. La actual versión del sistema produce errores de conteo y se necesitan ajustar parámetros.	Clasificador Bayes	Arámbula et al., 2005.
Caracterización automática de la forma de los protozoarios parásitos	Se clasifican siete especies de un mismo género en la etapas de quiste utilizando curvatura, tamaño, simetría y estructura.	Se incluyen factores como tamaño, forma, textura. Identificación y diagnóstico en línea (para otro protozoario) (http://puma.icb.usp.br/coc/cimorph)	Diagnóstico no en tiempo real. Se identifica una solo especie. Se necesita personal experto para el aislamiento de los quistes y modificación en Photoshop.	Clasificador Bayes Distribución Gauss	Castañón et al., 2006.
Técnica para la clasificación con momentos invariantes a través de imágenes de huevos de parásitos.	Clasifica 16 huevos de parásitos. Requiere de las etapas de pre-procesamiento, extracción con momentos invariantes.	Se identificar organismos de diversas especies. No necesario personal experto. Metodología para muestras clínicas (agua). Se incluyen factores como tamaño, forma, textura	Diagnóstico no en tiempo real.	Sistema de inferencia y procesamiento de información (ANFIS). Red neuronal MATLAB.	Dogantekin et al., 2008.

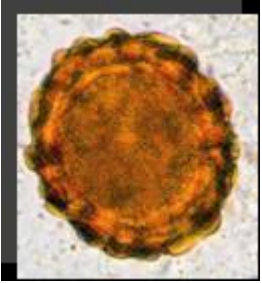
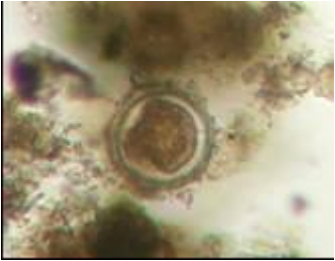

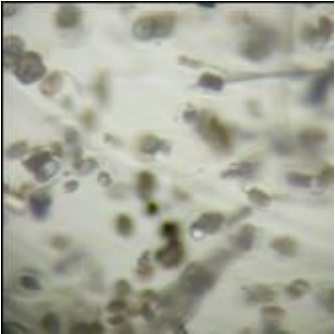
Metodología	Descripción	Ventajas	Desventajas	Programa	Referencia
Procesamiento automático de colonias de bacterias	<i>Procesamiento basado en un sistema de conteo de colonias de bacterias en cajas Petri.</i>	<i>Diagnóstico en tiempo real. Se identifican organismos de diversas especies. No se necesita personal experto.</i>	<i>Metodología usada en medios de cultivo. No es un programa rápido o ejecutable</i>	MATLAB	<i>Ates y Gerek (2009);</i>
Clasificación de huevos de parásitos humanos con máquina de vector de soporte multi-clase.	<i>Basado en identificación de cuatro características morfológicas en 16 parásitos.</i>	<i>Se identifican organismos de diversas especies. No necesario personal experto. Se incluyen factores como tamaño, forma, textura Plus: Incluye rotación y escalamiento de los huevos.</i>	<i>Diagnóstico no en tiempo real. Metodología para muestras clínicas (agua). Las formas similares de los huevos causan clasificaciones erróneas (incluir información adicional para estos casos).</i>	Nueva metodología a través de la máquina multi-clase (MCSVM) y momentos invariantes en parásitos. Red neuronal y MATLAB.	<i>Acvi y Varol, 2009.</i>
Detección de huevos helmintos mediante plantillas dinámicas	<i>Identificación de cinco especies de huevos de helmintos.</i>	<i>Realiza por micrografías identificaciones con altos valores de sensibilidad.</i>	<i>Pocas especies seleccionadas. No se realiza en tiempo real.</i>	MATLAB, filtro Canny, técnica Direct Least Fitting of Ellipses and Dynamic Time Warping de función a distancia.	<i>Chuctaya et al., 2010</i>
Detección y clasificación de huevos infectivos.	<i>Clasificación de Trichuris suis</i>	<i>Permite diferenciar entre huevos infectivos y no infectivos</i>	<i>Una sola especie a clasificar.</i>	MATLAB	<i>Musaeus et al., 2012</i>


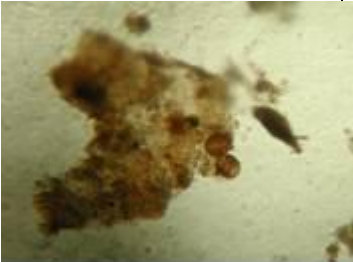
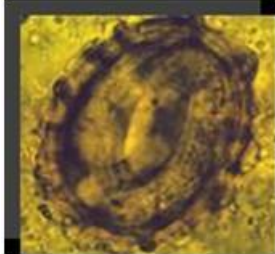
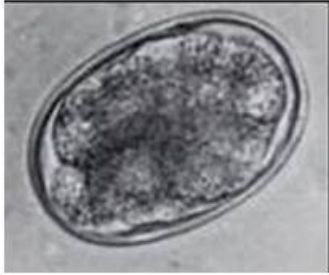
5.2 Generación de archivo fotográfico y selección de especies

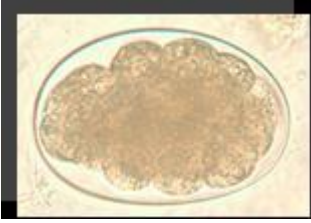


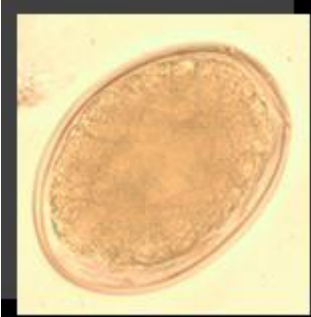
El archivo fotográfico se utilizó para seleccionar las especies a identificar; incluyó géneros y especies representativas, tanto de cestodos y trematodos como nematodos (Tabla 5). Se cuenta con un total de 23 géneros y 40 especies de huevos de helmintos clasificados.





Tabla 5. Archivo fotográfico de los huevos de helmintos en diversas matrices.



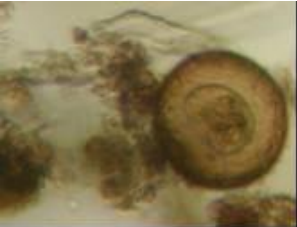
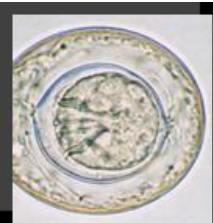

Especies de Helmintos	Variación morfológica	Características principales
<p><i>Ascaris lumbricoides</i> fértil</p> 	<p>85 a 95 μm de largo y 43 a 47 μm de ancho</p>	<p>Los huevos infértiles presentan forma elongada, membrana externa con o sin mamelones, producidos por hembras no fecundadas. Son más grandes que los fértiles, pueden tener diversas formas y es posible que les falte alguna capa. El contenido interno aparece desorganizado y globular. Llegan a ser confundidos con otros parásitos. Imagen de muestra ambiental</p> <p>Este tipo de huevos se llega a confundir con otras especies de helmintos, ya que carece de mamelones. Sin embargo, un detallado estudio muestra la desorganización del contenido interno además de globular.</p> <p>Huevo fértil e infértil mostrando las diferencias morfológicas. Uno parece mayor al otro y es evidente la desorganización interna del infértil.</p>
<p><i>Ascaris lumbricoides</i> infértil</p> 		
<p><i>A. lumbricoides</i> huevo fértil e infértil</p> 		




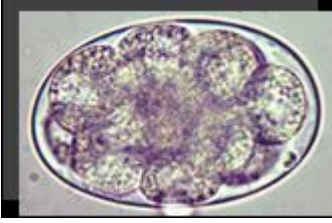
Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p data-bbox="183 359 459 436"><i>Ascaris lumbricoides</i> fétil</p>  	<p data-bbox="540 359 743 489">40 a 80 µm de largo y 35 a 50 µm de ancho</p>	<p data-bbox="792 359 1425 489">Forma esférica, color café o café amarillento por pigmentos biliares, membrana externa con ondulaciones o mamelones. Se nota la capa con mamelones.</p> <p data-bbox="792 793 1179 825">Imagen de muestra ambiental</p>
<p data-bbox="183 1077 459 1155"><i>Ascaris lumbricoides</i> Fértil (larvado)</p>  		<p data-bbox="792 1077 1425 1140">Huevo embrionado con larva infectiva en el segundo estadio.</p> <p data-bbox="792 1518 1179 1549">Imagen de muestra ambiental</p>

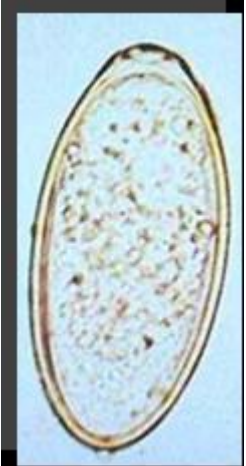


Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
		<p>Huevo sin mamelones, es decir se encuentra descortezado.</p>
		<p>Imagen de muestra ambiental</p>
<p data-bbox="183 1039 365 1071"><i>Ascaris suum</i></p> 	<p>50 a 80 μm de largo y 40 a 60 μm de ancho</p>	<p>Forma ancha y ovoide, con una cápsula gruesa y mamelonada albuminoide y de color café a dorado. Huevo embrionado con larva en Segundo estadio</p>
<p data-bbox="183 1367 479 1398"><i>Ancylostoma caninum</i></p> 		<p>Posee una forma ovalada, con una membrana externa delgada transparente.</p>


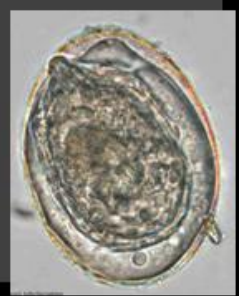

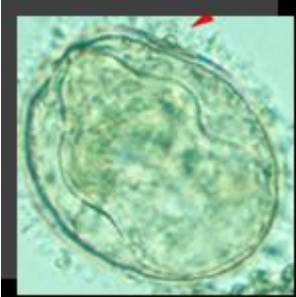
Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Ancylostoma duodenale</i></p> 	<p>60-75 μm y 35-40 μm</p>	<p>No pueden ser diferenciadas microscópicamente. Poseen capa delgada sin color.</p>
<p><i>Capillaria hepatica</i></p> 	<p>50-70 μm largo y 30-35 μm ancho</p>	<p>Cubierta estriada, con prominencias polares. Forma ovalada.</p>
<p><i>Capillaria philippinensis</i></p> 	<p>35 a 45 μm largo y 20-25 μm ancho</p>	<p>Poseen 2 prominencias en el extreme del huevo. Forma ovalada. Huevo con cubierta estriada.</p>
<p><i>Diphyllobothrium latum</i></p> 	<p>55 a 75 μm y 40 a 50 μm.</p>	<p>Céstodo. Forma ovalada a elipsoidal. De un lado con un operculo incospicuo y del lado opuesto (abopercular).</p>

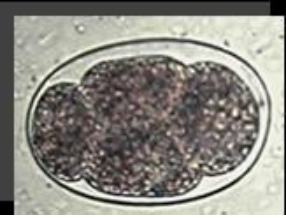

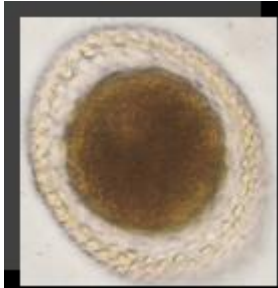

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Dipylidium caninum</i></p> 	<p>35 - 40 μm; largo a 27 a 48 μm ancho</p>	<p>Forma esférica a ovalada. Contiene una oncosfera que tiene 6 microganchos. Cada proglótido contiene paquetes esféricos a ovalados conteniendo de 5 a 15 o más huevos.</p>
<p><i>Echinococcus granulosus</i></p> 	<p>30-35 μm de diámetro</p>	<p>Huevos indistinguibles de los huevos de <i>Taenia</i> sp. Cubierta estriada, se encuentra una oncósfera con 6 ganchos retractiles.</p>
<p><i>Enterobius vermicularis</i></p>  	<p>55 mm por 25 mm</p>	<p>Forma asimétrica. De un lado más ovalado que otro. Posee una capa albuminosa fuertemente adhesiva, una capa hialina transparente y el embrión.</p> <p>Imagen de muestra ambiental</p>

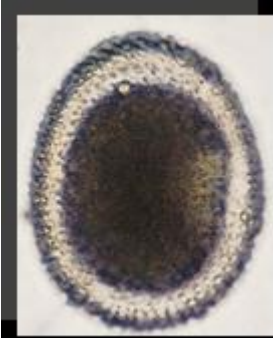
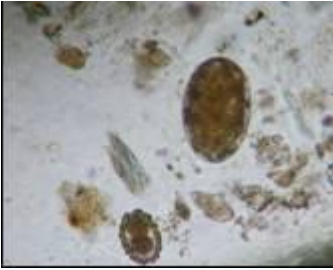
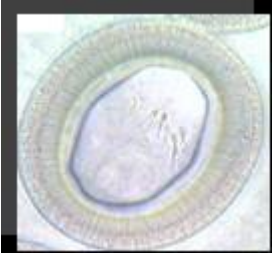
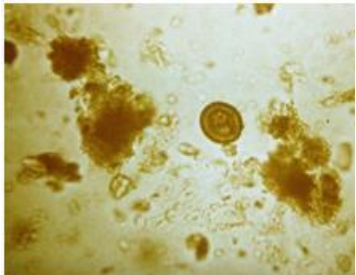
Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Gnathostoma</i> sp.</p> 		<p>Forma esférica a ovalada. Con opérculo a un extremo del huevo. Cubierta externa delgada.</p>
<p><i>Hymenolepis diminuta</i></p> 	<p>70 - 85 μm largo y 60 - 80 μm ancho</p>	<p>Forma esférica, diferente a <i>H. nana</i>. La capa externa café-amarillenta es de mayor tamaño y grosor. Sin filamentos polares. Se encuentra un espacio entre la membrana y la oncosfera. Tiene 6 ganchos</p>
	<p>30 a 50 μm de diámetro</p>	<p>Imagen de muestra ambiental</p>
<p><i>Hymenolepis nana</i></p> 		<p>Forma de esférica a ovoide, con un embrión denominado oncosfera y rodeado de un embrióforo con dos salientes polares en los que se observan de cuatro a ocho filamentos. Con 6 ganchos.</p>
		


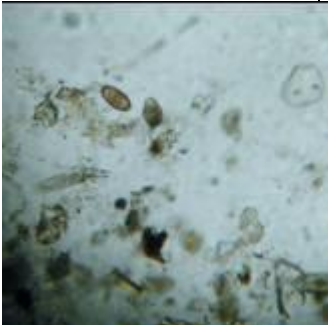

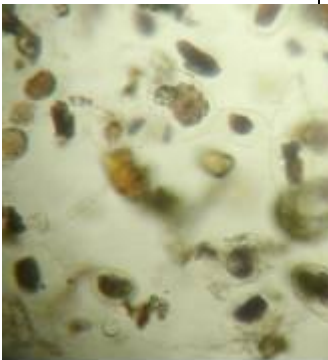
Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p data-bbox="185 306 464 390"><i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i></p> 	<p data-bbox="542 306 771 390">80-100 μm largo y 50 μm ancho</p>	<p data-bbox="789 306 1424 405">Forma ovoide. Cubierta café oscuro texturizada. Contiene una larva llamada acantor que posee ganchos en forma de róstelo.</p>
<p data-bbox="185 621 431 705"><i>Mammomonogamus laryngeus</i></p> 	<p data-bbox="542 621 716 657">323 X 50 μm</p>	
<p data-bbox="185 1041 358 1125"><i>Moniliformis moniliformis</i></p> 	<p data-bbox="542 1041 771 1125">90-125 μm largo y 65 μm ancho</p>	<p data-bbox="789 1041 1424 1140">Forma elongada. Cubierta de color claro. La larva (acantor) tiene ganchos en forma de róstelo.</p>
<p data-bbox="185 1461 407 1545"><i>Oesophagostomum</i> spp.</p> 	<p data-bbox="542 1461 771 1581">60-75 μm largo y 35-40 μm ancho</p>	<p data-bbox="789 1461 1424 1518">Difícil diferenciación microscópica entre Ancylostoma y Necator.</p>

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Oxyuris</i> sp.</p> 		<p>Huevo de helminto con forma elipsoide, paredes externas delgadas y contenido transparente.</p>
<p><i>Parascaris equorum</i></p> 	<p>100 μm</p>	<p>Huevo con forma esférica, membrana externa gruesa con prominencias, típico su color marrón.</p>
<p><i>Schistosoma haematobium</i></p> 	<p>110-170 μm largo y 40-70 μm ancho</p>	<p>Forma elongada-ovalada. Con una espina terminal.</p>

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Schistosoma intercalatum</i></p> 	140-240 μm	Similar a <i>S. haematobium</i> en cuanto a forma y la espina terminal, solo que más grandes, usualmente poseen un engrosamiento ecuatorial.
<p><i>Schistosoma japonicum</i></p> 	70-100 μm largo y 55-64 μm ancho	Forma esférica. La espina es mucho más pequeña y conspicua que otras especies.
<p><i>Schistosoma mansoni</i></p> 	114 -180 μm largo y 45-70 μm ancho	Forma característica, con una espina lateral prominente cerca del extremo posterior. El extremo anterior está ligeramente curvo. Contiene una larva llamada miracidio.
<p><i>Schistosoma mekongi</i></p> 	50-80 μm by 40-65 μm	Similar a <i>S. japonicum</i> aunque son más chicos de tamaño. Contienen también una espina conspicua.

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p><i>Strongyloides stercoralis</i></p> 	100 µm largo	Huevo con el interior granulado, capa externa muy delgada y transparente
<p><i>Taenia solium</i></p> 	30 µm de diámetro	Forma esférica, de paredes gruesas y radiadas. Posee una capa protectora denominada embríofo, dentro del cual se encuentra una oncosfera. Suele ser confundido con polen, por eso se deben tratar de observar los 6 ganchos del embrión.
<p><i>Taenia saginata</i> <i>Toxocara canis</i></p>  	75 a 95 µm de diámetro	<p>Huevo no embrionado. Forma esférica, presentan una cubierta gruesa y finamente granulada.</p> <p>Imagen de muestra ambiental</p>

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p data-bbox="186 367 381 399"><i>Toxocara cati</i></p>  		<p data-bbox="787 367 1421 472">Huevo no embrionado. Parásito de gatos, es menor en tamaño que <i>T. canis</i>. Posee igualmente superficie granulada.</p> <p data-bbox="787 766 1177 798">Imagen de muestra ambiental</p>
<p data-bbox="186 1060 414 1092"><i>Taenia saginata</i></p>  	<p data-bbox="544 1060 673 1144">30 µm de diámetro</p>	<p data-bbox="787 1060 1421 1228">Forma esférica, de paredes gruesas y radiadas. Posee una capa protectora denominada embrióforo, dentro del cual se encuentra una oncosfera, embrión o hexacanto.</p> <p data-bbox="787 1186 1177 1218">Imagen de muestra ambiental</p> <p data-bbox="787 1396 1177 1428">Imagen de muestra ambiental</p>

Especies de Helmintos	Tamaño	Características principales
<p data-bbox="186 346 435 380"><i>Trichuris trichiura</i></p>  	<p data-bbox="516 346 808 430">50 a 60 μm largo y 21 a 26 μm de ancho</p>	<p data-bbox="836 346 1398 514">Huevo no embrionado. Forma de bolillo o barril, color marrón amarillento, con una gruesa envoltura de doble contorno y los polos están constituidos por tapones translúcidos e incoloros.</p> <p data-bbox="836 682 1226 716">Imagen de muestra ambiental</p>
<p data-bbox="186 993 402 1026"><i>Trichuris vulpis</i></p>  		<p data-bbox="836 993 1398 1060">Huevo no embrionado. Mucho más grande que <i>T. trichiura</i>.</p> <p data-bbox="836 1430 1226 1463">Imagen de muestra ambiental</p>

Trichuris vulpis

Huevo no embrionado. Mucho más grande que *T. trichiura*.

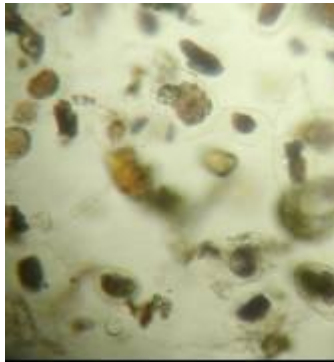


Imagen de muestra ambiental

Fotos: Ash,L. y Orihel,T., 1997.

Finalmente se eligieron las siete especies de helmintos considerando su importancia médica, distribución mundial y variación de su morfología: *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris trichiura*.

5.3 Manejo de la técnica tradicional para conteo de huevos de helmintos y generación de imágenes

Para el desarrollo del algoritmo, se capturaron más de 900 imágenes, tomando además otra serie de 621 para la validación del sistema, lo cual hace un total de 1,521. Se condensó la información de las especies de huevos de helmintos seleccionadas en la tabla 6, donde se presentan las características principales de los huevos de helmintos para ser reconocidos con mayor facilidad. En las imágenes, los

huevos fueron identificados con diferentes colores, abreviando su nombre científico con dos iniciales, además de anotaciones sobre su distribución geográfica.

Tabla 6. Características y claves principales de los huevos de helmintos seleccionados

	Clave	Tamaño	Forma	Observaciones	Distribución	Color
1) <i>Acaris lumbricoides</i>	AL	35-50W x 45-70L	Esférica	Ondulaciones en el contorno	Mundial	<i>Amarillo</i>
2) <i>Toxocara canis</i>	TX	75 a 95 µm D	esférica	Cubierta gruesa y finamente granulada	Mundial	<i>Verde</i>
3) <i>Trichuris trichiura</i>	TT	20-24W x 50-55L	Elíptica	Doble contorno. Los polos están constituidos por tapones translúcidos.	Mundial	<i>Morado</i>
4) <i>Hymenolepis nana</i>	HN	30 a 50 µm D	Esférica	El embrión posee 6 ganchos	Mundial	<i>Rojo</i>
5) <i>Hymenolepis diminuta</i>	HD	114 - 180L µm 45-70W µm	Esfrica	Presenta espina lateral	Mundial	<i>Naranja</i>
6) <i>Taenia</i> sp.	TA	30 µm D	Esférica	Paredes gruesas, radiadas. Embrión con ganchos	Mundial	<i>Azul</i>
7) <i>Schistosoma mansoni</i>	SM	80 µm	Ovoidal	Con espina lateral	África	<i>verde</i>

5.4 Procesamiento de imágenes y desarrollo del algoritmo

Se empleó un clasificador Bayesiano caracterizado por ser un sistema robusto en donde las imágenes son procesadas mediante la reducción del ruido y segmentación para su extracción y cálculo de características de los huevos de helminto encontrados en aguas residuales como: *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris trichiura*.

El procesamiento de las imágenes llevó a cabo en diversas etapas: captura de la imagen, conversión a escala de grises, filtrado anisotrópico, ajusta de contraste, binarización de imagen (método de Otsu), Relleno de zonas vacías, eliminación de objetos y etiquetado. Los primeros resultados del procesamiento, cálculos y gráficas se encuentran en los Anexos del 3 al 5. A partir de ello, y siendo etapas de ensayo y error, se restablecieron las características trascendentales para la óptima clasificación de las imágenes de los huevos de los helmintos. En la gráfica de la Fig. 26 se muestra la distribución de áreas por especie, se puede observar escaso solapamiento entre las especies, significando una característica imprescindible para el sistema.

El tamaño del huevo es un elemento importante para identificar las especies. Sin embargo, son otras las características discriminativas entre las especies de huevos de helmintos, como son el: área, perímetro, compacidad, excentricidad, propiedades de textura, momentos invariantes de Hu, entropía, energía, media de nivel de gris y homogeneidad. A pesar de que los huevos de *A. lumbricoides*, por sus características morfológicas fueron fácilmente identificables, en el sistema se produjo una confusión entre el huevo fértil e infértil, esto debido a que los segundos tienden a asemejarse con los primeros, ya que su contenido interno no se encuentra organizado.

5.4.1 Problemáticas que enfrentada por el algoritmo

En el caso de huevos de la especie de *Toxocara canis* llegaron a confundirse con *Hymenolepis diminuta*, principalmente por el tamaño y forma semejantes de ambos huevos, sobre todo cuando el algoritmo no detecta las diferencias en la estructura de sus bordes.

En lo que respecta a la especie de *Trichuris trichiura*, la cual fue confundida por el sistema con *Hymenolepis nana* y con algunos otros objetos (basura) presentes en la muestra. Esta especie (*T. trichiura*) al encontrarse inmersa entre los restos de la materia orgánica y detritus, pierde su forma elíptica, característica que es esencial para que el sistema lo clasifique de forma correcta.

Los huevos de *Taenia* sp, debido a su tamaño menor, con respecto al respecto de las otras especies de helmintos seleccionadas, fue clasificada adecuadamente, excepto en algunos pocos casos en donde es confundida como otros objetos. Dentro de la muestra llegan a existir formas como burbujas o simplemente polen de plantas con forma similar a esta especie; no obstante, su coloración típica hace que al procesar la imagen, sus niveles de grises sean acoplados y de esta manera identificada de forma adecuada.

La especie de *Hymenolepis nana* fue de la que más dificultades presentó para el sistema, ya que debido a su transparencia llega a perder su delimitación por los bordes que se disipan con el fondo de la imagen y por tanto es erróneamente clasificada. Para poder incrementar la eficiencia de detección se realizaron ajustes al algoritmo.

Con respecto a los huevos del trematodo *Schistosoma mansoni*, que al poseer una forma elíptica, borde irregular y tamaño mayor de 100 μm , su clasificación por parte del sistema se llevó de forma adecuada; sin embargo, en algunos casos, fue catalogado como otros objetos, confundiéndolo con basura, debido a su borde.

5.5 Validación del algoritmo

Al llevar a cabo la comparación entre la identificación y cuantificación de las siete especies de huevos de helmintos, entre la identificación de la técnica norma y el algoritmo desarrollado, utilizando los tres tipos de calidades de agua residual, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tipo I: < 10 mg/L SST, los valores tanto para la sensibilidad como para la especificidad, fueron óptimos y confiables, 83% y 99%, respectivamente, remarcando un sistema confiable.

Tipo II: >40 a 150 mg/L SST, para el agua tipo dos y a pesar de que la muestra presentara una mayor cantidad de basura, con respecto a una agua tipo I; presentó un patrón similar, con una sensibilidad del 80% y una especificidad de 98%. Sin embargo, el sistema presentó cierto grado de confusión entre huevos fértiles y no fértiles para la especie de *Ascaris lumbricoides*, así como entre el reconocimiento de *Toxocara canis*, con *H. diminuta*, *Taenia* sp. y *Schistosoma mansoni* con otros objetos

Tipo III: < 240 a 763 mg/L SST, No fue calculada debido a la alta cantidad de sólidos.

En el algoritmo desarrollado, se logran detecciones en tiempo real para las diversas formas de los huevos de helmintos (redondas, ovaladas, elípticas). No todas las características analizadas (eje menor, eje mayor, compacidad, etc.) sirvieron para distinguir entre las distintas especies de huevos de helmintos. El tamaño del huevo es un elemento importante para la identificación de las especies. Sin embargo, el uso de otras características discriminativas entre las especies de huevos de helmintos, son esenciales, ya que el área, perímetro, compacidad, excentricidad, propiedades de textura, momentos invariantes de Hu, entropía, energía, media de nivel de gris y homogeneidad permitieron en conjunto, que a cada especie le fuera asignado utilizando un clasificador bayesiano, un valor determinante para su identificación, por ejemplo:

5.5.1 Selección de características

Se realizaron distribuciones Gaussianas para varias de las características seleccionadas, esto con el fin de ratificarlas y llevar a cabo la diferenciación e identificación entre las especies de huevos de helmintos; algunas de estas fueron: el área (Fig. 26), el diámetro (Fig. 27), excentricidad (Fig. 28), Entropía (Fig. 29), eje menor (Fig. 30). Cada una de las campanas indica los valores en los que cada especie de huevo de helminto se encuentra. Como se observa en la identificación por áreas, esta característica no se sobrelapa entre todas las especies, por lo que ha sido una buena opción para clasificar a los huevos. El diámetro por otro lado es una característica que se empalma y no permite distinguir entre las diferentes especies, por lo que no fue elegida. La excentricidad es una característica que ayudó a identificar a los huevos de los helmintos, por lo que se eligió como característica discriminativa entre las especies. La entropía que es una medida de la uniformidad interna de los huevos, aunque presentó sobrelapamiento entre las especies, permitió distinguir entre algunas de ellas como *Taenia* y *Ascaris*, ya que su energía interna o nivel de gris en el primero era uniforme, mientras que en el otro era más desarreglado. El eje menor también fue elegido como uno de los parámetros para discriminar, ya que la anchura de los huevos de los helmintos cambia, debido a que se eligieron diversas morfologías de ellos.

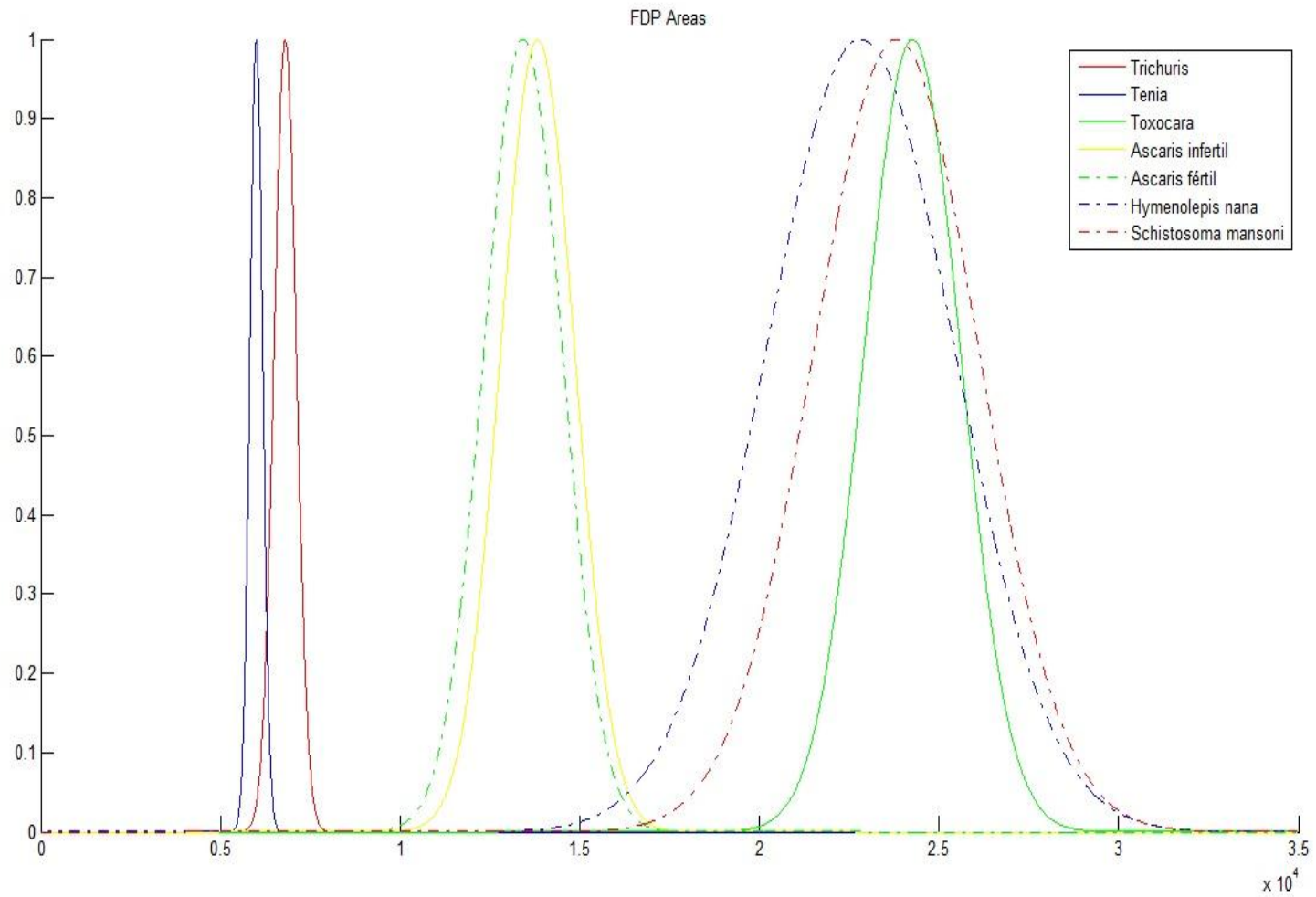


Fig. 26 Identificación por áreas de las especies de huevos de helmintos.

Diámetro.- Cálculo del diámetro para los huevos de helmintos seleccionados.

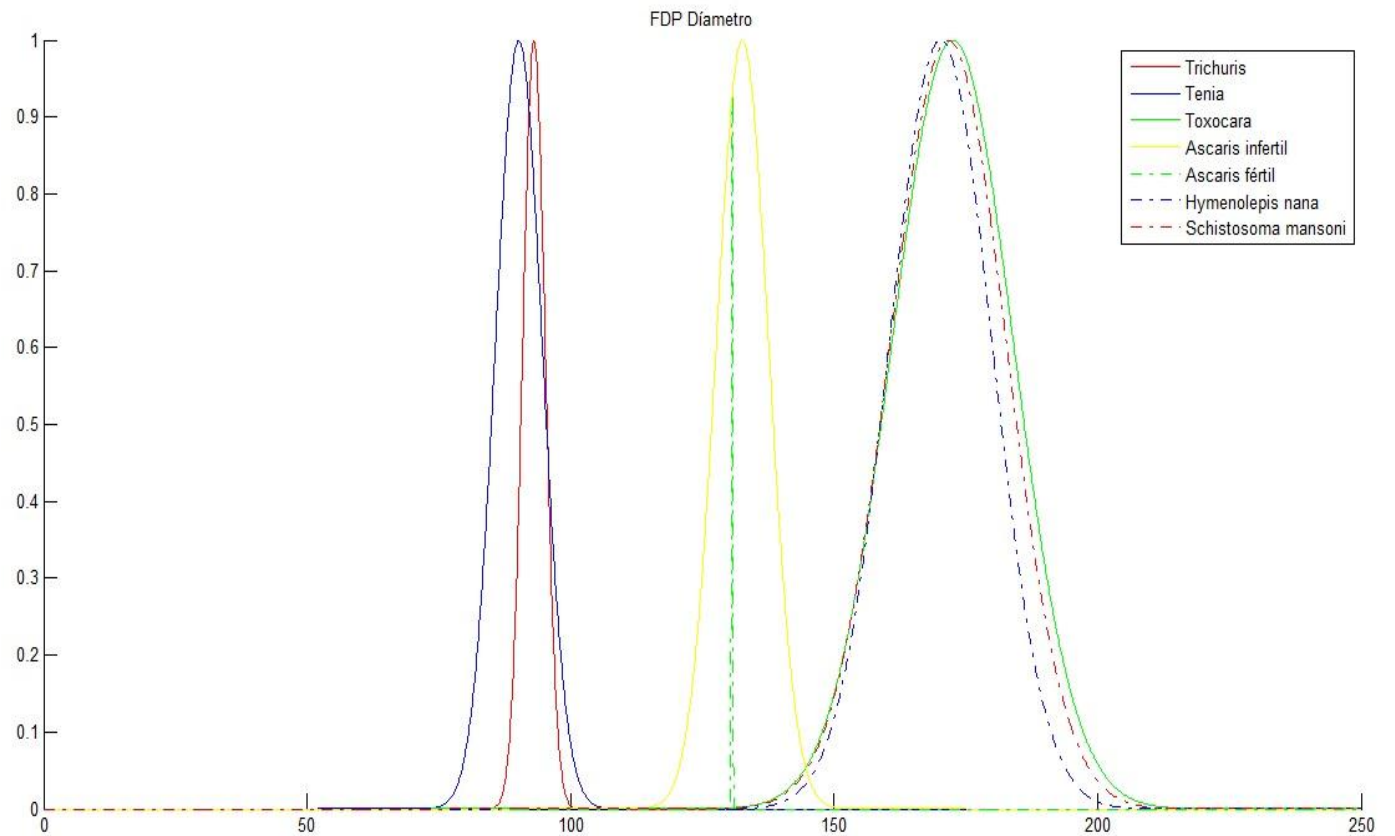


Fig. 27. Distribución Gaussiana del diámetro entre las especies.

Excentricidad

En el análisis de ésta característica para los helmintos, hay un solapamiento entre algunas de las especies; sin embargo, llega a ser una característica discriminativa.

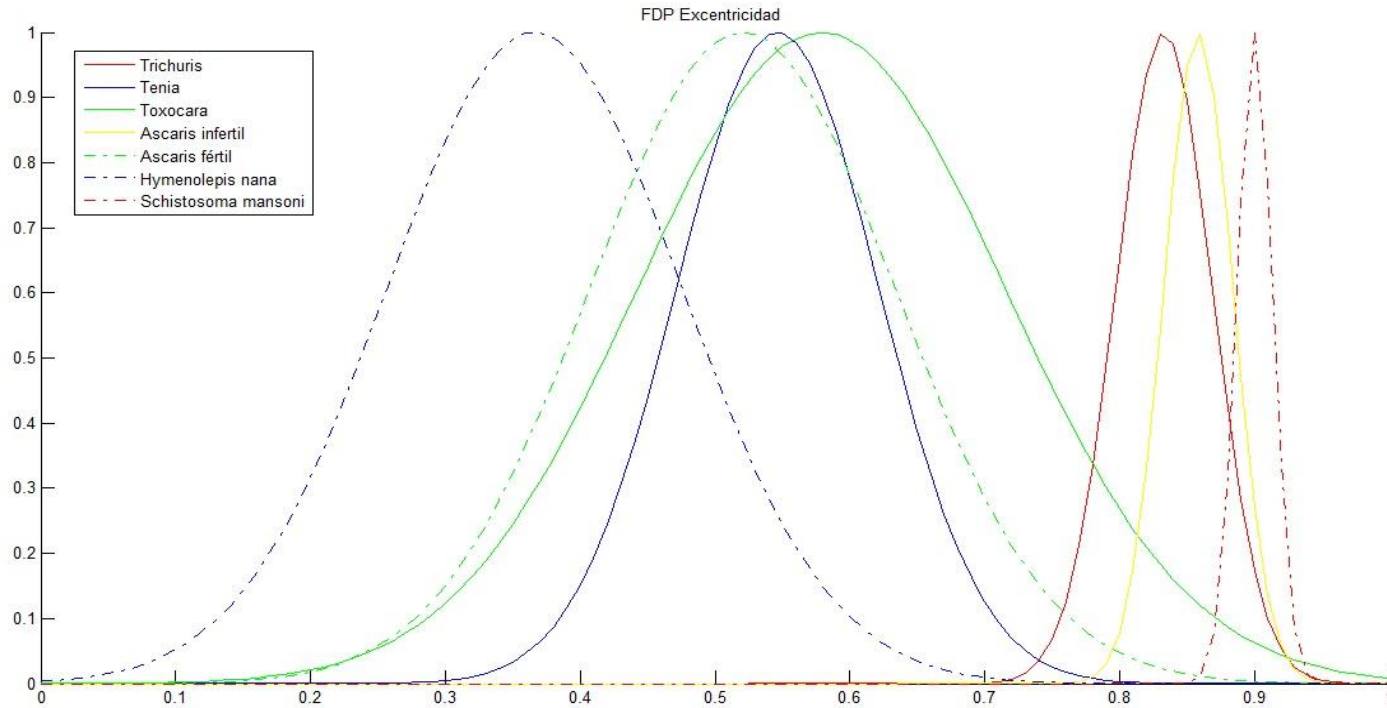


Fig.28 Gráfica de identificación por excentricidad de las especies de huevos de helminto.

Entropía. La entropía detectó que por ejemplo los huevos de *Taenia* sp. en donde su interior es uniforme, el valor de su entropía fue bajo, en cambio los áscaris infértiles poseen baja uniformidad, por lo que su entropía fue alta.

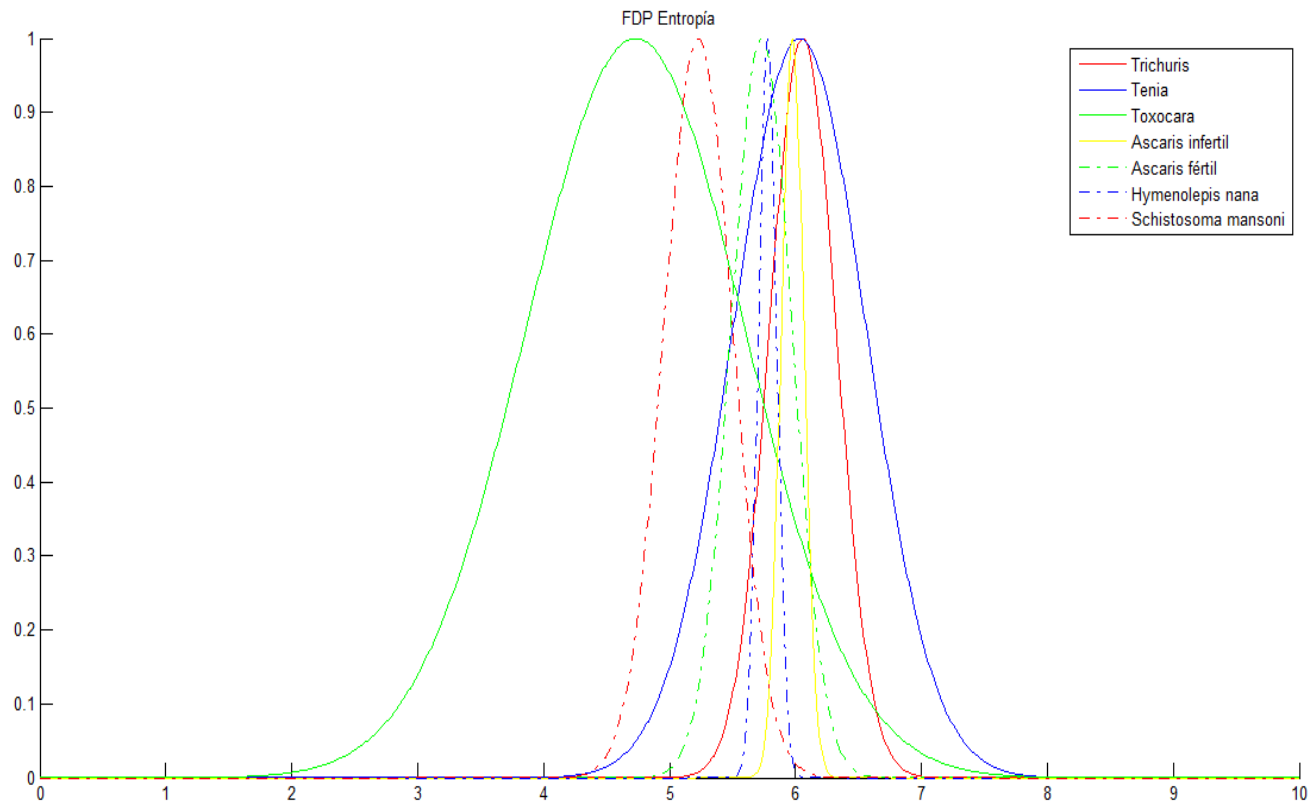


Fig. 29 Cálculo de la entropía de las diversas especies de huevos de helmintos

Eje menor

Esta medida resultó óptima para la clasificación de las especies de huevos de helmintos a diferencia del eje mayor que no contrastaba entre una ni otra especie de helminto.

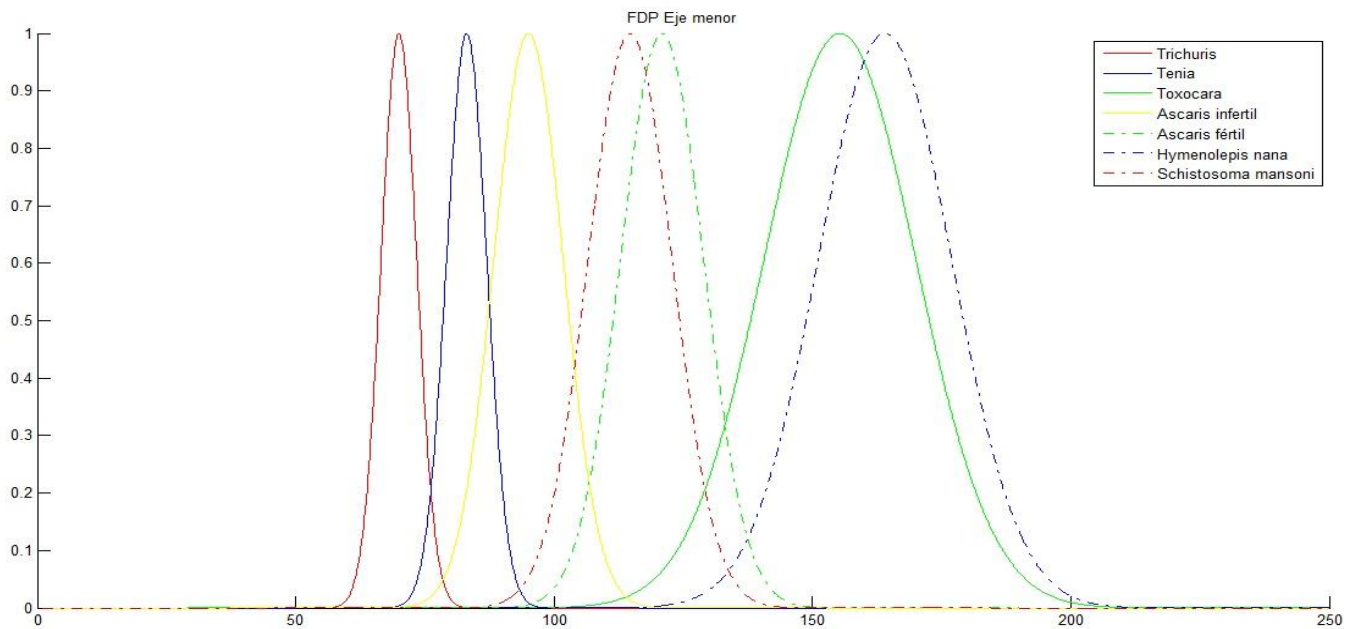


Fig. 30 Distribución Gaussiana del eje mayor de las especies de helmintos seleccionadas

Compacidad

La característica usada para separar a los huevos de los helmintos de otras estructuras que los rodean, es la compacidad. La compacidad dejó de formar parte de elementos del conjunto de entrenamiento y solo se usó para eliminar basura, con un umbral de 0.30. Fue en esta característica que las especies mostraron diferentes distribuciones sin solapamiento y por tanto el algoritmo no las confunde unas con otras.

Una vez etiquetados los huevos y obteniendo las características deseadas para su identificación, se incorporaron los datos al algoritmo.

Para probar la efectividad del sistema se calcularon la sensibilidad y especificidad, es decir los falsos negativos y falsos positivos. El cálculo de ambas características arrojó los siguientes resultados:

Sensibilidad: 0.8291 %

Especificidad: 0.9190 %

El algoritmo trabajó adecuadamente aunque fue conveniente realizar ajustes en el tren de procesamiento para incrementar al valor de la sensibilidad, es decir el resultado de los verdaderos positivos.

Las características empleadas en el clasificador después de someter diversas a pruebas fueron: el área, el eje menor del objeto, la excentricidad, el diámetro y la entropía. Las medias y desviaciones estándar de cada característica de los huevos de helmintos fueron calculadas (Anexo 4). Esto ayudó a establecer una referencia en cuanto a forma, tamaño y textura para clasificar e identificar a los huevos. *Hymenolepis nana* fue excluida debido a que hasta el momento no se cuenta con un método confiable para su segmentación.

Para la especie *H. nana*, se llevaron a cabo ajustes, ya que el huevo al ser transparente, toma otro tipo de valores. Ecualizando a la imagen, sus bordes fueron resaltados y finalmente clasificados.

Segmentación de las imágenes de los huevos de helmintos

Las imágenes segmentadas, que es cuando ya ha sido detectada la imagen para poder ser identificada por el algoritmo, se muestran a continuación (Figs. 31-33):

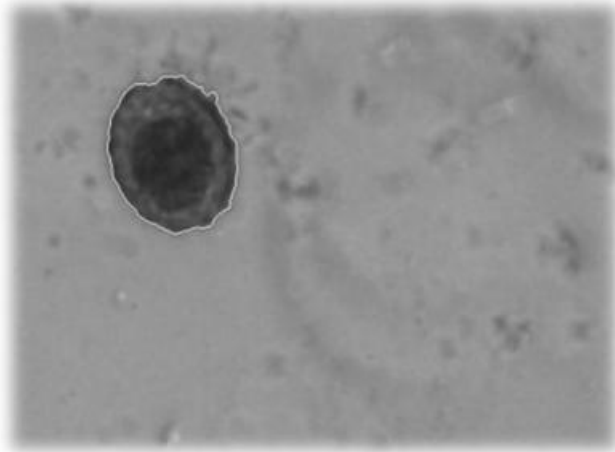


Fig. 31. *A. lumbricoides* segmentado, se demarcan sus bordes por la línea blanca.

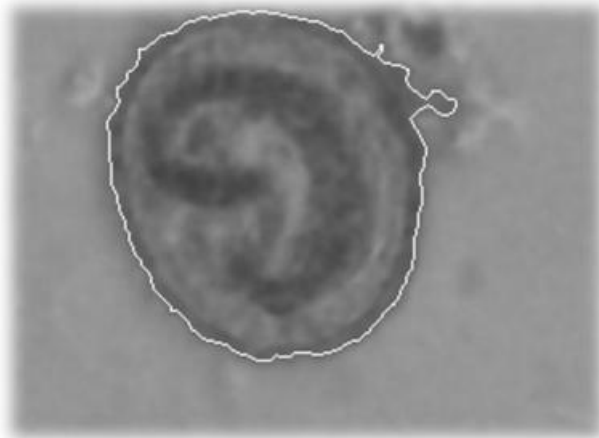


Fig. 32 *A. lumbricoides* segmentado con mayor aumento

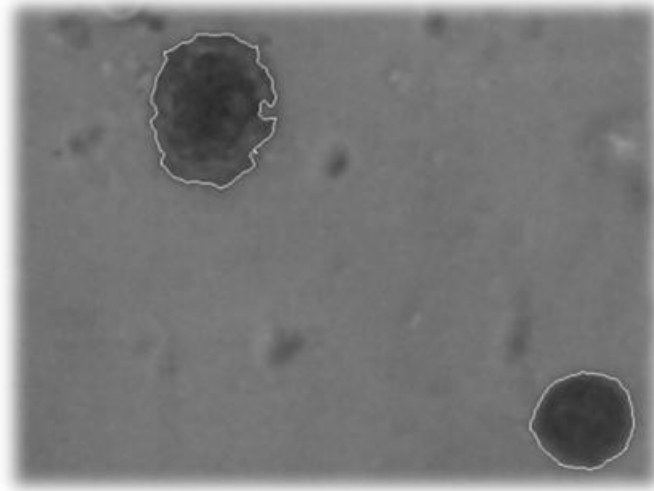


Fig.33 *A. lumbricoides* y *T. solium* segmentadas

Para validar el sistema se emplearon diez imágenes de cada una de las especies de helmintos. Esto proyectó que el Método Tradicional (MT) fue más eficiente que el Algoritmo de Detección (AD). La única especie de helminto que fue detectada de la misma forma por el MT y el AD fue *T. trichiura*. Las demás especies se tuvieron ciertos sesgos cuando trataron de ser identificados por el algoritmo de detección, como se muestra en la Figura 34.

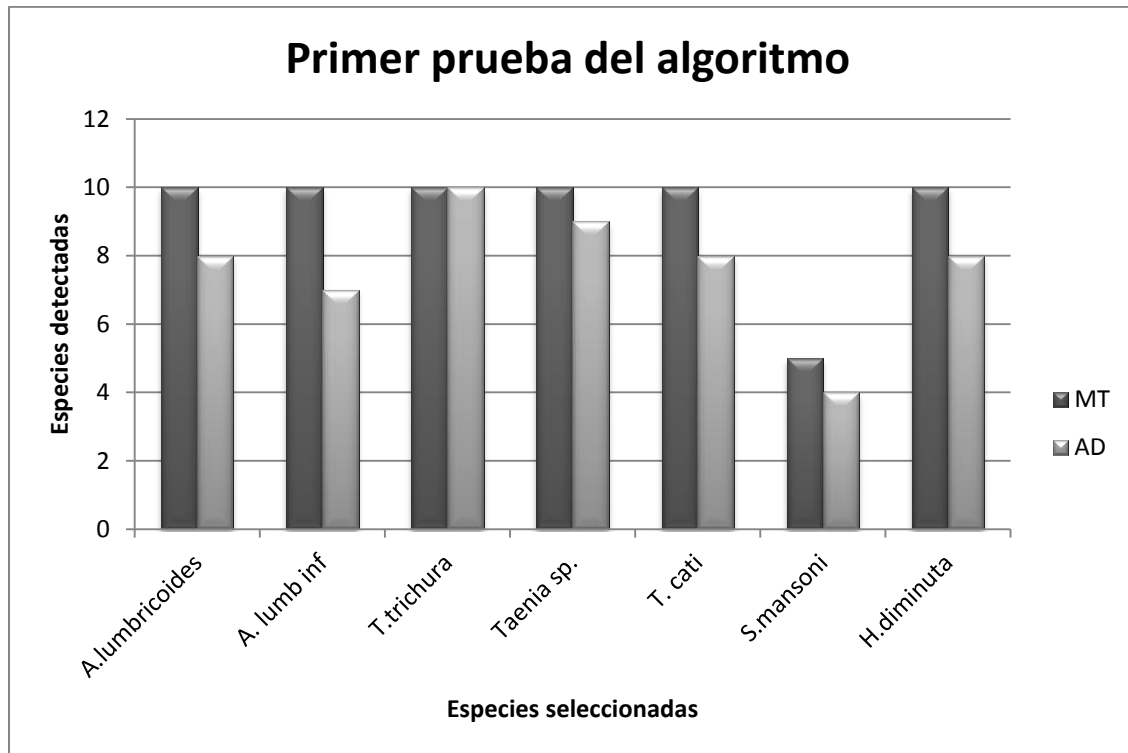


Fig. 34 Gráfica de validación de primeros resultados del Método tradicional (MT) y el Algoritmo de Detección (AD).

Se realizó una matriz de confusión o contingencia (Tabla 7), la cual es una herramienta que se emplea en el aprendizaje supervisado como son los clasificadores para probar su sensibilidad y especificidad. Cada columna de la matriz representa el número de predicciones de cada especie de huevo de helminto, mientras que cada fila representa a las instancias en la clase o especie real.

Tabla 7. Matriz de confusión o contingencia. Primeras pruebas del algoritmo.

	<i>A lumbricoides.</i> fértil	<i>A.lumbricoides</i> infértil	<i>T. cati</i>	<i>T. trichiura</i>	<i>Taenia</i> sp.	<i>H. diminuta</i>	<i>S.mansoni</i>
<i>AL. fértil</i>	8/10	1/10					
<i>AL. infértil</i>	1/10	7/10					
<i>Toxocara</i>			7/10				
<i>T. trichiura</i>				10/10			
<i>Taenia sp.</i>					9/10		
<i>H. diminuta</i>			1/10			8/10	
<i>H. nana</i>							
<i>S.mansoni</i>							4/5
Otros objetos	1/10	2/10	2/10	1/10	1/10	2/10	1/5

Tabla 8. Resultados de especificidad y sensibilidad. Primeras pruebas del algoritmo

	A <i>A.lumbricoides.</i> fértil	<i>A.lumbricoides</i> infértil	<i>T. cati</i>	<i>T. trichiura</i>	<i>Taenia</i> sp.	<i>H. diminuta</i>	<i>S.mansoni</i>
Verdaderos positivos	8	7	7	10	9	8	4
Verdaderos negativos	56	38	75	61	43	52	23
Falsos positivos	3	3	2	8	7	3	1
Falsos negativos	2	3	3	0	1	2	1
Sensibilidad	0.8	0.7	0.7	1	0.9	0.8	0.8
Especificidad	0.949152542	0.926829268	0.97402597	0.884057971	0.86	0.945454545	0.9583333

Sensibilidad promedio: 0.8291
Especificidad promedio: 0.9190

5.5.2 Mejoramiento y ajustes del algoritmo de prueba

Al considerar los resultados de las pruebas iniciales del algoritmo se decidió realizar algunos ajustes para mejorar los porcentajes de sensibilidad y especificidad (Fig. 34), y así realizar una última validación del sistema. Las modificaciones efectuadas se resumen en la figura 35.

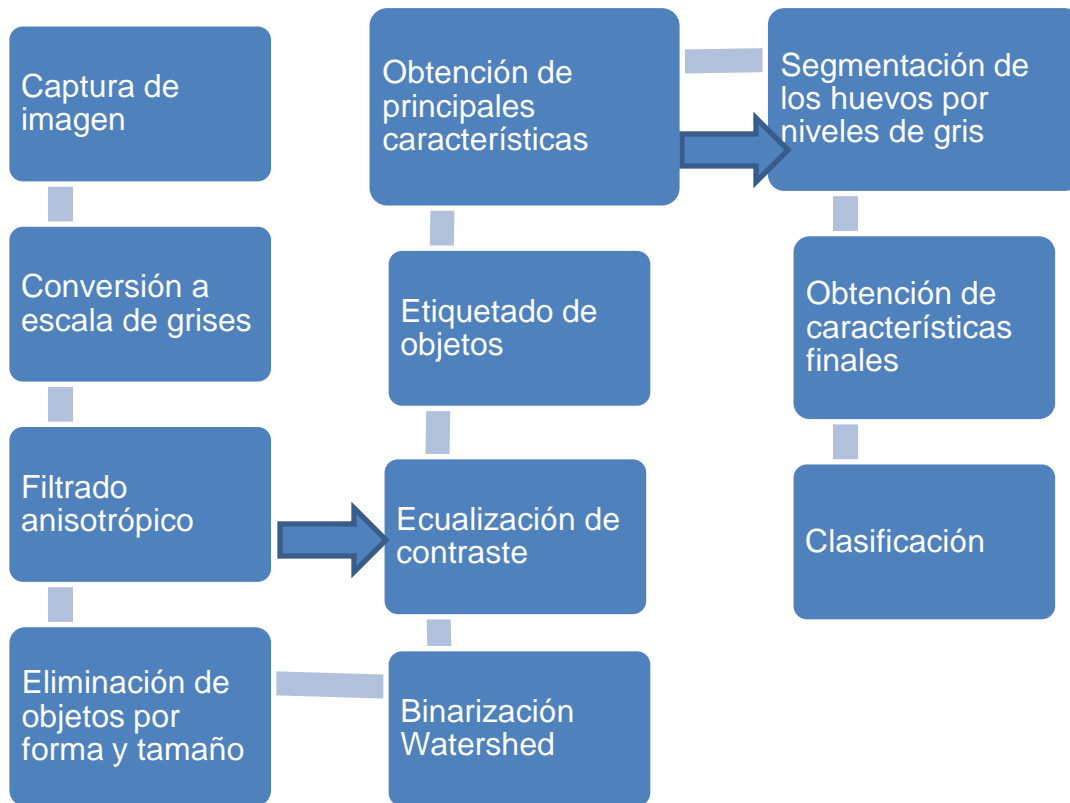


Fig.35 Mejoras realizadas en el proceso del algoritmo de detección

En resumen la mejora consistió en la aplicación de un protocolo de segmentación basado en el **perfil de escala de grises** de los objetos de destino (los huevos de helmintos). Esto se llevó a cabo la obtención de los perfiles de la escala de grises desde el centro del objeto como punto de partida y hasta 1.5 veces el tamaño de su eje principal (Fig. 36). Se ecualizó el contraste de la imagen una vez que se etiquetaron los objetos, esto para mejorar la identificación por el algoritmo.

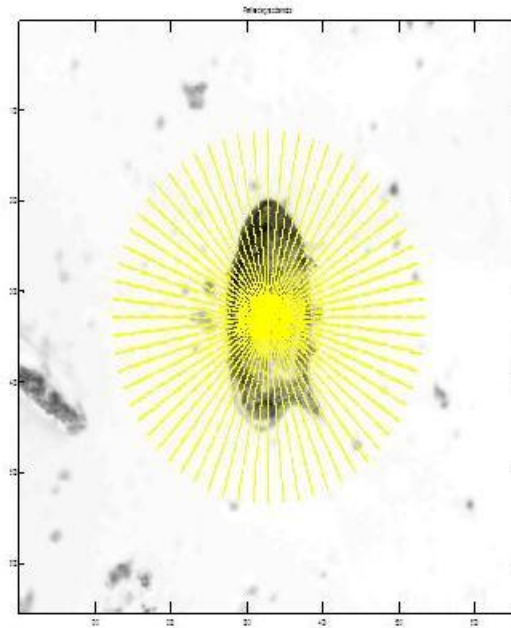


Fig. 36 Área a considerar para el escalamiento de grises del procedimiento de segmentación en las mejoras del sistema.

A partir del área, un perfil promedio (P_{medio}) fue calculado, utilizando perfil anterior (P_{ant}), el perfil del centro (P_{cent}) y el perfil siguiente (P_{sig}). En la Figura 37 se muestran en azul los perfiles anteriores, el central y el perfil siguiente en rojo.

$$P_{medio} = \frac{P_{ant} + P_{cent} + P_{sig}}{3}$$

(9)

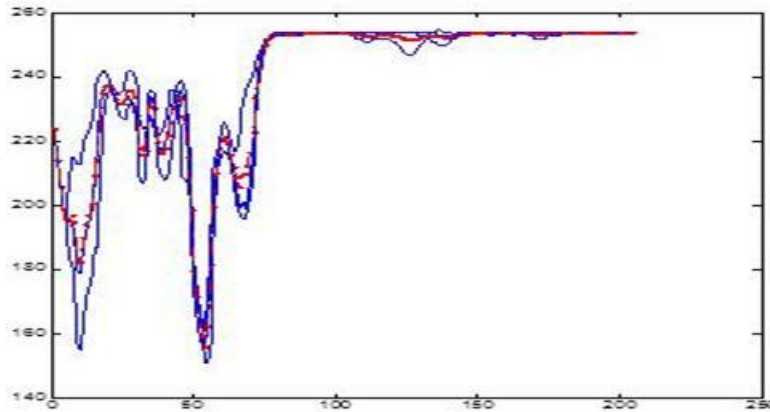


Fig.37 Promedio de perfiles anterior, central y siguiente para un área de huevo de helminto.

Se calculan estos perfiles para determinar donde se encuentran los límites entre las regiones, sombras y ruido visual de la imagen. Una vez calculado el perfil medio, la media del fondo se obtuvo a partir de la media de la imagen desde el segmento considerado el eje mayor al final del vector. De igual manera la desviación estándar es calculada (*Std fondo*).

$$Media\ del\ fondo = \frac{1}{N} \sum_{i=eje\ mayor}^N P_{medio}(i) \quad (10)$$

$$Std_{fondo} = \frac{1}{N} \sum_{i=eje\ mayor}^N (P_{medio}(i) - Media\ del\ fondo)^2 \quad (11)$$

Por último, los sectores del perfil de color gris que se deben tomar como secciones de huevo son los que están bajo el umbral de tolerancia (Fig. 37). Este umbral se calculó mediante la ecuación 12:

$$Umbral = Media\ del\ fondo - Std\ fondo \quad (12)$$

Se muestra en la figura 38 el resultado final de una imagen procesada mediante MATLAB.

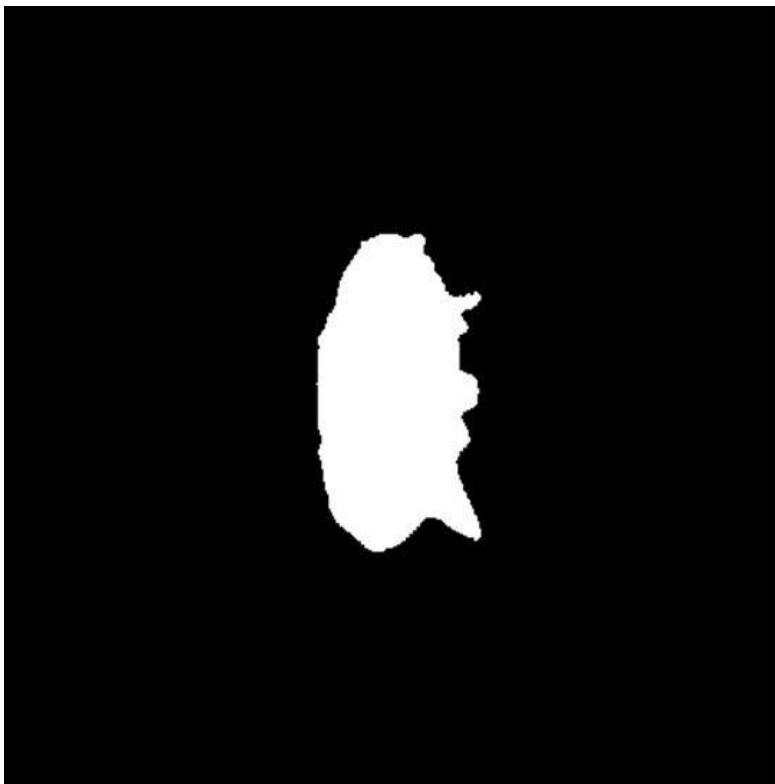


Fig. 38 Resultado final de la imagen procesada (*S. mansoni*)

Para la validación final, posterior a los ajustes realizados, se utilizaron las Tablas correspondientes a los tipos de agua I y II (ANEXO 6); finalmente en el ANEXO 7 se presentan **las imágenes post-procesamiento** aptas para ser sometidas al software de identificación. Debido a la complejidad del agua tipo III, únicamente se trabajó con los dos primeros tipos de agua. A cada imagen se le asignó un número consecutivo indicado al inicio de la Tabla y en seguida la cantidad de huevos de helmintos, por especie. Las anotaciones fueron realizadas de manera manual al observar las imágenes directamente de las muestras, es decir mediante la técnica tradicional.

5.5.3 Pruebas de validación

Los resultados obtenidos para la validación del agua tipo I (Tablas 9 y 10), con un contenido menor de 10 mg/L de SST, se muestra en la Fig. 40 y en el caso del agua tipo II (Tablas 11 y 12), con un contenido de 10 a 100 mg/L de SST en la Fig 41. La tasa de precisión por especie para los diferentes tipos de agua (I y II) también es mostrada. En las Tabla 9 podemos observar que las especies con mayor número de detección para el agua tipo I son: *Ascaris* infértil, *Taenia* sp., *Hymelopsis diminuta*, logrando casi un 100% de la detección y en la siguiente Tabla (10) se reflejan éstos resultados de esta detección, aumentando la especificidad que es el cálculo de los verdaderos positivos, huevos que han sido detectados correctamente. En la Tabla 11, muestra los valores para el agua tipo II, observando que hay una mayor cantidad de huevos a detectar, esto debido a la carga de sólidos en el agua; las especies que siguen siendo identificadas correctamente con un mayor número de precisión son *Ascaris*, *Toxocara*, *Taenia* sp. y *S. mansoni*, ésta última especie quizás debido a su baja concentración en los tipos de agua. De igual manera en la Tabla 12 se reflejó la especificidad de las especies al ser identificadas por el algoritmo, logrando mayores valores las especies mencionadas.

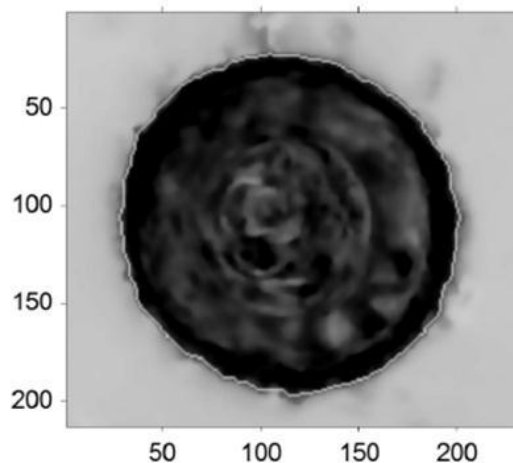


Fig. 39 *Hymenolepis diminuta* para su segmentación final. Se puede observar la muestra en una ventana sin basura alrededor para su posterior segmentación.

Tabla 9. Matriz de confusión. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo I. Pruebas finales del algoritmo

	AL. fétil	AL. infértil	Toxocara	T. trichiura	Taenia sp.	H. diminuta	H. nana	S.mansoni
<i>AL. fétil</i>	8/10	1/10						
<i>AL. infértil</i>	1/10	9/10						
<i>Toxocara</i>			8/10			1/10		
<i>T. trichiura</i>				8/10			1/10	
<i>Taenia sp.</i>					9/10			
<i>H. diminuta</i>			2/19			9/10		
<i>H. nana</i>				1/10			8/10	
<i>S.mansoni</i>								8/10
Otros objetos	1/10	0/10	0/19	1/10	1/10	0/10	1/10	2/10

Tabla 10. Sensibilidad y especificidad. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo I. Pruebas finales del algoritmo

	AL. fértil	AL. infértil	Toxocara	T. trichiura	Taenia sp.	H. diminuta	H. nana	S.mansoni
Verdaderos positivos	8	9	8	8	9	9	8	8
Verdaderos negativos	89	89	89	89	90	88	89	89
Falsos positivos	1	1	1	1	0	2	1	1
Falsos negativos	2	1	2	2	1	1	2	2
Sensibilidad	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.8
Especificidad	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	1	0.9777	0.9888	0.9888
Coef. DICE	0.8421	0.9	0.8421	0.8421	0.9473	0.8571	0.8421	0.8421

Sensibilidad promedio: 0.8375
Especificidad promedio: 0.9902

Tabla 11. Matriz de confusión. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo II. Pruebas finales del algoritmo

	AL. fértil	AL. infértil	Toxocara	T. trichiura	Taenia sp.	H. diminuta	H. nana	S.mansoni	Otros objetos
<i>AL. fértil</i>	19/24	2/10							6/362
<i>AL. infértil</i>	3/24	7/10							4/362
<i>Toxocara</i>			15/19			2/12			2/362
<i>T. trichiura</i>				8/11			2/13		4/362
<i>Taenia sp.</i>					11/14				3/362
<i>H. diminuta</i>			3/19	1/11		9/12			2/362
<i>H. nana</i>							10/13		4/362
<i>S.mansoni</i>								11/12	2/362
Otros objetos	2/24	1/10	1/19	2/11	3/14	1/12	2/13	3/12	335/362

Tabla 12. Sensibilidad y especificidad. Función de detección umbralizado Otsu para agua tipo II. Pruebas finales del algoritmo

	AL. fértil	AL. infértil	Toxocara	T. trichiura	Taenia sp.	H. diminuta	H. nana	S.mansoni	Otros objetos
Verdaderos positivos	19	7	15	8	11	9	10	11	335
Verdaderos negativos	453	467	458	463	453	465	464	465	115
Falsos positivos	6	4	2	4	3	2	4	2	11
Falsos negativos	5	2	4	3	3	3	3	1	27
Sensibilidad	0.7916	0.7777	0.7884	0.7272	0.7857	0.75	0.7692	0.9166	0.9254
Especificidad	0.9869	0.9915	0.9956	0.9914	0.9935	0.9957	0.9914	0.9951	0.9126

Sensibilidad: 0.8036
Especificidad: 0.9838

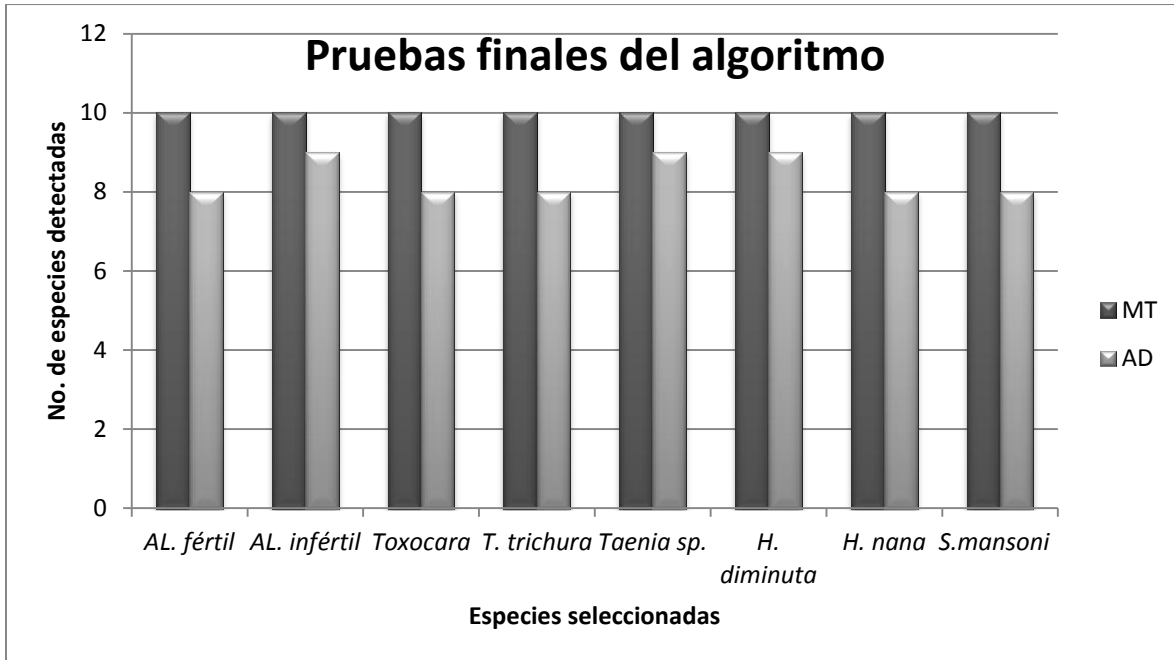


Fig. 40 Resultados de pruebas finales del algoritmo. Detección por especie para agua tipo I.

Debido a la alta concentración de huevos de helmintos y materia en esta última prueba, el algoritmo de detección (AD), no logró alcanzar el porcentaje de detección por el método tradicional (MT); esto debido a que las pruebas realizadas con el método tradicional, dieron un 100% pues fueron realizadas por expertos en el laboratorio de parasitología. El algoritmo de detección debe ser mejorado aún para poder alcanzar dichos valores de identificación.

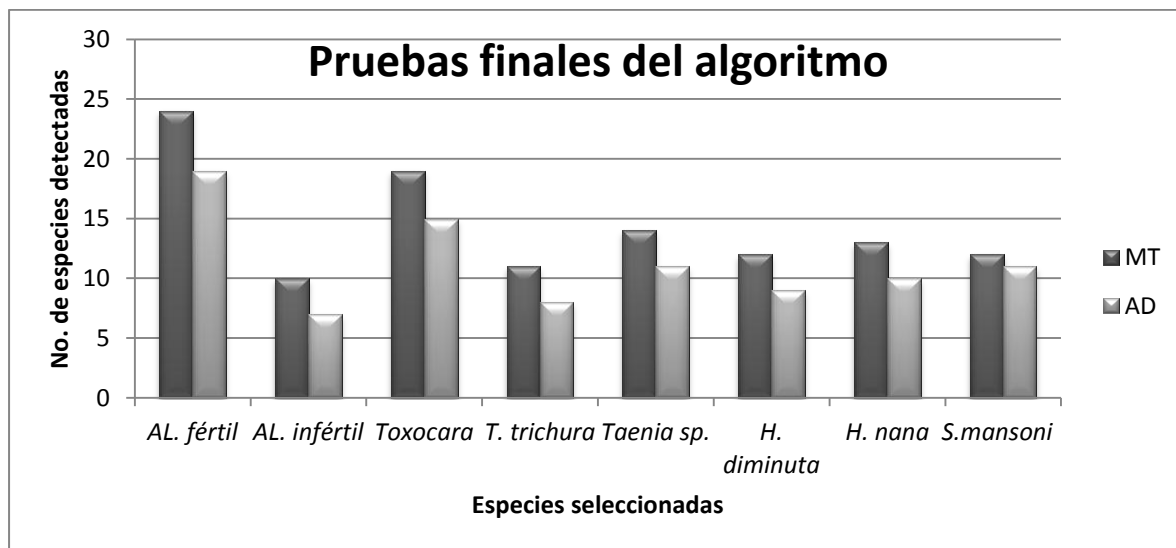


Fig 41. Resultados de pruebas finales del algoritmo. Detección por especie agua tipo II.

De igual manera para el agua tipo II, no se logra una detección similar al método tradicional, a pesar de que este tipo de agua fue más complicada que el agua Tipo I, debido a su carga de sólidos suspendidos totales. Esto deja prueba de que el algoritmo ha mejorado con respecto a las primeras pruebas realizadas, sin embargo, debe ser mejorado para alcanzar el nivel deseado.

5.5.4 Ventajas y desventajas del sistema desarrollado

La versión final de la concatenación de partes del sistema se muestra a continuación (Fig. 42), para esto, se acoplaron múltiples componentes tanto el microbiológico como el computacional en el laboratorio; de esta manera se realiza el procedimiento en tiempo real. Se realizó además una comparación entre el método tradicional y el algoritmo de detección en cuanto a costos (Tabla 13) y se anexan las imágenes finales segmentadas de cada especie de huevo (anexo8).

Esto indica que aunque el costo inicial del sistema (algoritmo de detección) es superior al de método tradicional, al haber una identificación continua de muestras y huevos de helminto, se permite la óptima clasificación de las especies, siempre y cuando el algoritmo haya sido mejorado. Sin embargo, permite que la detección de las especies lo realice cualquier persona sin entrenamiento para la identificación, ya que depende de la habilidad del observador.

Tabla 13. Ventajas y desventajas del sistema

	<i>Método tradicional</i>	<i>Algoritmo de detección</i>
Habilidades requeridas para la detección	De 2 a 3 semanas como mínimo	No requeridas
Tiempo de identificación	Muestras limpias una hora Muestras sucias tres horas o mas	Una muestra 10 minutos como máximo
Costo inicial del sistema (solo hardware).	USD \$ 20,000	USD \$30,000
Costo del proceso de identificación	Muestras limpias USD \$10 Muestras sucias USD \$35	USD \$2 máximo (agua tipo I y II)
Procesamiento de muestras	3 a 4 muestras por día	indeterminadas
Sensibilidad	depende de la habilidad humana	80.36%
Especificidad	No determinada	98.38%

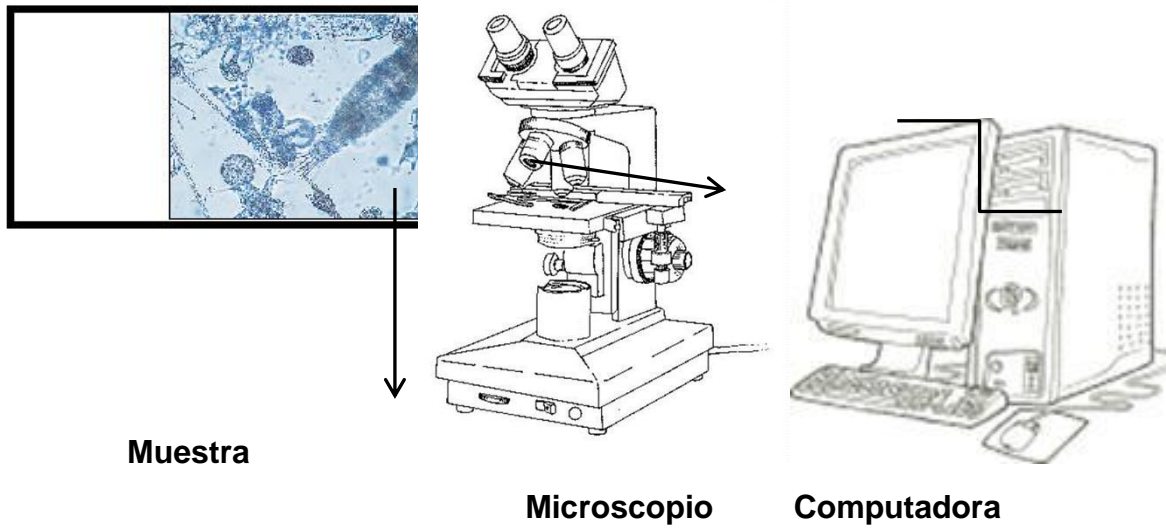


Fig.42 Software instalado en laboratorio. La muestra es tomada con ayuda de una micropipeta, el volumen deseado a analizar se coloca en el portaobjetos, posteriormente se ajusta el microscopio en el objetivo seco débil y la imagen es capturada por el programa Ivision en la computadora, en donde inmediatamente es procesada por el algoritmo desarrollado.

6. CONCLUSIONES

El desarrollo de un programa de cómputo para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos fue posible acoplando las técnicas de procesamiento de imágenes para la identificación y cuantificación de siete diferentes especies de huevos de helmintos, y resultando así una alternativa rápida (1 minuto) y precisa (98.38%) en comparación con la técnica norma tradicional.

Las metodologías de los estudios previos como la identificación de colonias bacterianas, identificación de células tisulares, de protozoarios y huevos de helmintos, permitieron desarrollar un método adecuado para el procesamiento de las imágenes al obtener datos relevantes (identificación a tiempo real, acoplamiento del microscopio a la computadora) para el desarrollo del algoritmo. Sin embargo, se hicieron pruebas y ensayos para ajustar apropiadamente la metodología al algoritmo de detección adaptado a las características y propiedades específicas de los huevos de helmintos.

El archivo realizado con a los datos de las imágenes que resaltan su morfología, y distribución de los huevos de los helmintos proporcionó las bases para poder seleccionar las especies de interés de acuerdo a ciertas características como su morfología.

La validación del sistema, en la cual se ocuparon dos de los tres tipos de calidad de agua para verificar la veracidad del algoritmo desarrollado frente a la técnica norma tradicional, permitió, además, optimizar el algoritmo con base en diversas adecuaciones y correcciones aplicadas como por ejemplo los cambios en el algoritmo de procesamiento de las imágenes para poder segmentar los huevos de los helmintos y así ser identificados por el sistema.

El procesamiento de las imágenes previo a la identificación de las especies, arrojó importantes avances en el incremento de la precisión para el conteo y la clasificación en las subsecuentes fases del algoritmo, de forma particular en lo referente a la especificidad y la sensibilidad del sistema. Sin embargo, es necesario ajustar aún más

la segmentación de las estructuras así como su clasificación para mejorar los valores obtenidos en las especies de huevos que salieron bajos por ejemplo (*Ascaris infértil* e *H. diminuta* con 70%) e incrementar el número de especies identificadas. Los elementos borrosos como la basura, impidieron un correcto procesamiento, obstaculizando así como la óptima interpretación de la imagen, por lo que una dilución (1 ml) puede ayudar a corregir tales problemáticas.

Se logran detecciones en un lapso promedio de un minuto, lo cual es 50% menor a la técnica norma tradicional de detección de huevos de helmintos que ocupa hasta varias horas para el mismo número de imágenes.

Las especies con mayor número de falsos negativos observadas fueron para el caso de *Taenia* sp. y *Trichuris trichiura*; esto se debe a la similitud de sus formas con otros objetos como basura y burbujas en la muestra (detritus). Por lo cual se debe ajustar el algoritmo para detectar con mayor claridad y segmentando con mayor precisión a estas especies.

El agua tipo III y debido al bajo porcentaje de sensibilidad (15%), no fue utilizada para la validación. Para solventar esta situación, una dilución puede ser efectuada (1 ml) cuando la muestra este siendo procesada. Además deben realizarse mejoras y mayores ajustes al algoritmo y con ello segmentar correctamente los huevos de los helmintos y diferenciarlos cuando existe una carga mayor de detritus

. Recomendaciones

La realización de un manual del usuario aunado a un tutorial es importante para el funcionamiento del sistema, ya que instruye al usuario en el manejo del programa y la solución de los problemas que puedan suceder en la operación.

Dado que el sistema es un proceso dinámico, el incremento de la sensibilidad y especificidad en la identificación del número de especies podrá seguir incrementando hasta tener mejores resultados.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Instituto de Ingeniería de la UNAM y al proyecto de la Fundación BILL & MELINDA GATES por su apoyo y patrocinio para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

El sistema se encuentra a la fecha (octubre 2013) en proceso de patente con el registro:

MX/a/2013/01 0641.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arámbula, F., Márquez J.A., Padilla, S., Solano, P.Tato (2005). *Automatic analysis of immunocytochemically stained tissue samples*. Medical and Biological Engineering and Computing, **43**(5): 672-677.

Assavasilavasukul P., Lau B., Harrington G., Hoffman R., Borchardt M. (2008). *Effect of pathogen concentrations on removal of Cryptosporidium and Giardia by conventional drinking water treatment*. Water Research, **42**: 2678- 2690

Ash,L., Orihel,T., (1997). *Atlas of human parasitology*. 4ta ed. American Society of Clinical Pathologists. Chicago. 410 p.

Ash, L y Orihel, T. (2010). Atlas de Parasitología Humana. 5 ed. México. Panamericana. 197 p.

Avcı, D., Varol, A. (2009). *An expert diagnosis system for classification of human parasite eggs based on multi-class SVM*. Expert Systems with Applications **36**: 43-48

Ayres R., Alabaster G., Mara, D., and Lee D. (1992). *A Design equation for human intestinal nematode egg removal in waste stabilization ponds*. Water Research, **26**(6): 863-86.

Blumenthal U., Cifuentes E., Bennett S., Quigley M., Ruiz-Palacios G. (2001). *The risk of enteric infections associated with wastewater reuse: the effect of season and degree of storage of wastewater*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. **95**: 131-137.

Botero, D., Restrepo, M. (2003). *Parasitosis humanas*. Corporación para la Investigación Biológica. Fondo editorial CIB. 4ta edición. Bogotá, Colombia. 419 p.

Calderón, Ó. 2004. Parasitología general. Elementos y actividades. 1 ed.Editoral de la Universidad de Costa Rica. 90 p.

Castañón, C., Fraga J., Fernandez, S., Gruber, A., Costa, L. 2006. *Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus Eimeria*. Pattern Recognition **40**:189-191

Chávez, A., Jiménez, B., Maya, C. (2004). "Particle size distribution as a useful microbial detection". *Water Science and Technology*. **50** (2): 179-186.

Chuctaya, J., Mena, J., Humpire, G., Rodríguez, A., Beltrán, C., Patiño, R. (2010). *Detección de huevos helmintos mediante plantillas dinámicas*. Universidad Nacional de San Agustín, Perú. Sociedad Peruana de Computación.

Ciesielski, V. Spicer, J. (1994). Embedding neural nets and expert systems in diagnostic microbiology laboratories. Royal Melbourne Institute of Technology. 42-46p.

Cuamba, G. (2008). *Toxocara Canis*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Michoacán. 46 p.

Danckaert, A., Gonzalez-Couto, E., Bollondi, L., Thompson, N., Hayes, B., (2002) *Automated Recognition of Intracellular Organelles in Confocal Microscope Images. Traffic*, **3**: 66-73.

Dauguschies, A., Imarom, S., & Bollwahn, W. (1999). Differentiation of porcine imeriaspp. By morphological algorithms. *Veterinary Parasitology* **81**: 201–210.

Diaz, F.; Corchado, J.; (1999); *Rough sets bases learning for Bayesian networks*. International workshop on objective bayesian methodology.

Dmitryjuk, M., Zoltowska, K., Kubiak, K y Glowinska, A. 2006. Changes in trehalase activity and trehalose level during *Ascaris suum* (Nematoda) embryogenesis. *Helminthologia*, **4**(3) 3:130-133.

Dogantekin, E., Yilmaz. M., Dogantekin, A., Avci, E., Sengur, A. (2008). *A robust technique based on invariant moments – ANFIS for recognition of human parasite eggs in microscopic images*. *Expert Systems with Applications* **35**: 728–738.

Ellis, K.V., Rodríguez, P.C.C. and Gómez, C.L. (1993). *Parasite ova and cysts in waste stabilization ponds*. *Water Research*. **27**:1455-1460.

Foreyt, W., Foreyt B. (2001). *Veterinary parasitology reference manual*. Iowa State University Press. 5 ed. USA. 225 p.

Fairbairn D., Passey B. (1954). *The lipid components in the vitelline membrane of Ascaris lumbricoides eggs*. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **33**: 130-134.

Flores, L., Fernández, F. (2008). *Las redes neuronales artificiales, fundamentos teóricos y aplicaciones prácticas*. Serie de metodologías y análisis de datos en ciencias sociales. Netbiblo. España. 135 p.

Flusser, J. (2000). *On the independence of rotation moment invariants*. Pattern Recognition **33**: 1405-1410.

Friedman, N., Geiger, D., Goldszmidt, M. (1997). *Bayesian network classifiers*. Machine Learning, **29**:131-163.

Fried B. and Abruzzi A. (2010). Food-borne trematode infections of humans in the United States of America. *Parasitol Res.* **106**(6):1263-1280.

Galindo, J. (1999). Control Difuso: *Metodología de Diseño, Estructura, Controladores Adaptativos (Ajuste) y Ejemplos. Conjuntos y Sistemas Difusos (Lógica Difusa y Aplicaciones)*. Departamento de Lenguajes y Ciencias de la Computación. Universidad de Málaga. 1-25.

Gonzalez, R. C. y Woods, P., (2002) *Digital Image Processing*, Addison Wesley, USA.

Hernández, E. Maya, C. (2009). *Inactivación de huevos de helmintos bajo el efecto sinérgico de temperatura, óxido de calcio (cao) y humedad*. Tesis de grado de maestría. Reyes Iztacala, Edo. de México. 91 pp.

Habtamu K, Degarege A, Ye-Ebiyo Y y Erko B. (2011). *Comparison of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for the diagnosis of soil-transmitted helminth infections*. *Parasitology International*. **60**: 398–402.

Jiménez B. (2007). *Helminth ova removal from wastewater for agriculture and aquaculture reuse*. *Wat. Sci. and Techn.* **55**:485-493.

Joachim, A., Dulmer, N., y Dauschies, A. (1999). *Differentiation of two Oesophagostomum spp. from pigs, O. dentatum and O. quadrispinulatum, by computer-assisted image analysis of fourth-stage larvae*. *Parasitology International* **48**: 63–71.

Kaufmann, J. (1996). *Parasitic infection of domestic animals: a diagnosis manual*. Birkhauser. Boston. 392 p.

Keiser J, Utzinger J. (2009). Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev.* **22**:466-483.

Kreitz, S., Hess, A., Anderson, T.H., (1995) *Direct enumeration and size classification of soil bacteria using confocal laser scanning microscopy and image analysis*. *IEEE*, 454-457pp.

Lamothe, R., García, L. (1988). *Helmintiasis del hombre en México*. AGT editor, S.A. 59-69 p.

Larry S. Roberts, John Janovy Jr. *Foundations of Parasitology*. (2008), 8th ed, Barnes&Noble.

Lefebvre F. and Poulin R. (2005). Progenesis in digenean trematodes: A taxonomic and synthetic overview of species reproducing in their second intermediate hosts. *Parasitology* **130**:587-6

Maya, C., Jiménez, B. y Schawartzbrod, J. (2006). *Comparision of Techiniques for detection of helminth ova in drinking water and wastewater. Water Environment Research*, **78**(2): 118-124.

Mendoza, P y Alatorre, R. 2011. Nemátodos, un mundo de gusanos. Ciencia y desarrollo. Mayo- Junio «<http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/252/default.html>»

Musaeus, J., Christian M., Jens, O., Carstensen, M. (2012) *.Detection and classification of parasite eggs for use in helminthic therapy*. Facultad de Ciencias, Universidad de Copenhagen, Frederiksberg, Dinamarca. **78**:577-582.

NOM-003-SEMARNAT (1996). *Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*. Diario Oficial de la Federación. 24 de Diciembre de 1996.

NOM-003-SEMARNAT (1997). Límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. Diario Oficial de la Federación.

Norma Mexicana NMX-AA-113-SEMARNAT-1999. *Método para la detección y enumeración de huevos de helmintos en aguas residuales y lodos*. Diario Oficial de la Federación, Agosto 5, 1999.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SEMARNAT-2002. *Protección ambiental- lodos y biosólidos- especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final*. Diario Oficial de la Federación 2002.

NMX-AA-113-SCFI-2012 ANÁLISIS DE AGUA – medición del número de huevos de helminto en aguas residuales y residuales tratadas por observación. Diario Oficial de la Federación 2012.

OMS. 2012. Estadísticas sanitarias mundiales. Suiza. 178 pp.

Page, D., Dillon ,P., Toze, S., Bixio, D., Genthe, B., Jiménez, B., Wintgens, T.(2010). *Valuing the subsurface pathogen treatment barrier in water recycling via aquifers for drinking supplies*. *Wat Res.* **44**:1841 – 1852.

Perona, P. y Malik, J. (2002). *Scale space and edge detection using anisotropic diffusion*, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* **12**: 629–639.

Pumarola, A; Rodríguez-Torres, A; García, R.J.A. y Piedrola, A.G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Ediciones Científicas y Técnicas, S. A. Barcelona, España. 850- 880 pp.

Ranefall, P., Wester, K., Bengtsson, E., (1998). *Automatic quantification of immunohistochemically stained cell nuclei using unsupervised image analysis*. *Anal.Cel.Path.* **16**:29-43 p.

Roerdink, J; Meijster, A. 2001. *The watershed transform: definitions, algorithms and parallelization strategies*. *Fundamenta Informaticae*. Netherlands **41**:187-228.

Rojas N, Orta T, Vaca M y Franco V (2003). *Generation of by products resulting from ozone application on intestinal parasites in wastewater, XXX International Association for Hydraulic Research Congress, Tesalónica, Grecia*. 549 – 556p.

Salgado, G. (2006). *Zootaxa; checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico*. Magnolia Press. México. 357 p.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica. 2005. Secretaría de Salud. México. 47 p.

Sommer, C. (1996). *Digital image analysis and identification of eggs from bovine parasitic nematodes*. *Journal of Helminthology*, **70**: 143–151.

Sommer, C. (1998a). *Quantitative characterization of texture used for identification of eggs of bovine parasitic nematodes*. *Journal of Helminthology*, **72**(2): 179–182.

Sommer, C.(1998b). *Quantitative characterization, classification and reconstruction of oocyst shapes of Eimeria species from cattle*. *Parasitology*, 116, 21–28.

Wharton (1983). *The production and functional morphology of helminth eggs-shells*. *Parasitology* **86**: 85-97.

UNAQ, Universidad Nacional de Quilmes. 2005. Ing. en Automatización y Control Industrial. Visión Artificial
<http://iaci.unq.edu.ar/materias/vision/archivos/apuntes/Segmentaci%C3%B3n%20por%20Umbralizaci%C3%B3n%20-%20M%C3%A9todo%20de%20Otsu.pdf>

WHO (1989). *Health Guidelines for the use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture*. Technical Report Series No 778, World Health Organization, Geneva Suiza.

WHO (2006). *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*. Vol. 1-2: Wastewater use in agriculture. Geneva.

Yang, Y. S., Park, D. K., Kim, H. C., Choi, M., y Chai, J. (2001). *Automatic identification of human helminth eggs on microscopic fecal specimens using digital image processing and an artificial neural network*. IEEE Transactions on Biomedicine, **48**(6): 718–730.

Young, D., Glasbey, C.A., Gray, A.J., Martin, N.J., (1995). *Identification and sizing of cells in microscope images by template matching and edge detection*. IEE Image Processing And Its Applications. Conference publication. **410**: 266-270.

Xu, D., Li, H. (2008). *Geometric moment invariants*. Pattern Recognition **41**:240 – 249.

Páginas web

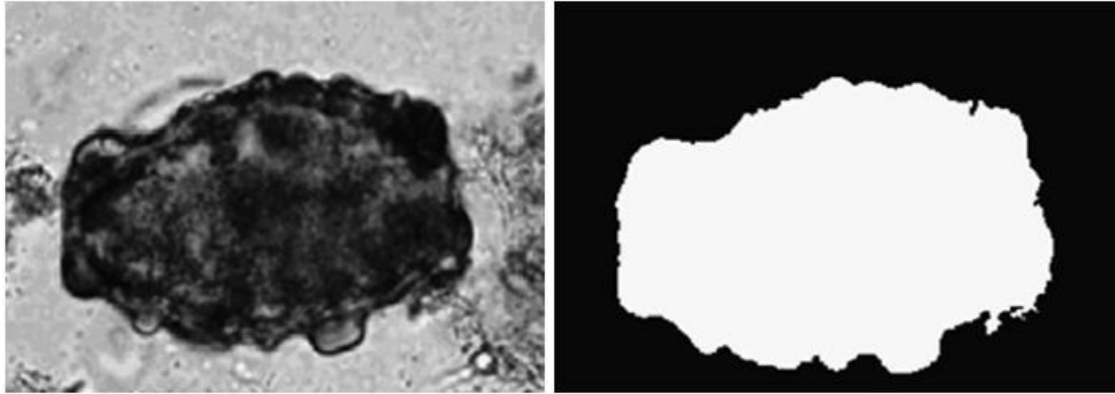
http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Hymenolepiasis_il.htm

<http://instruction.cvhs.okstate.edu/jcfox/htdocs/clinpara/chart.htm>

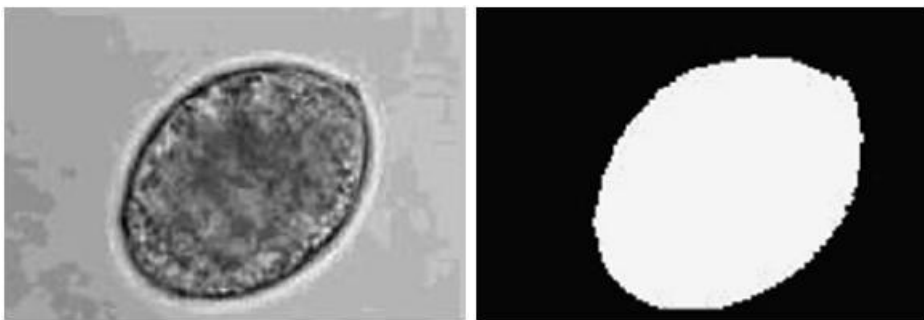
<http://www.icb.usp.br/~marcelcp/>

ANEXO 1. Contornos de huevos de helmintos utilizados por Dogantekin *et al.* (2008).

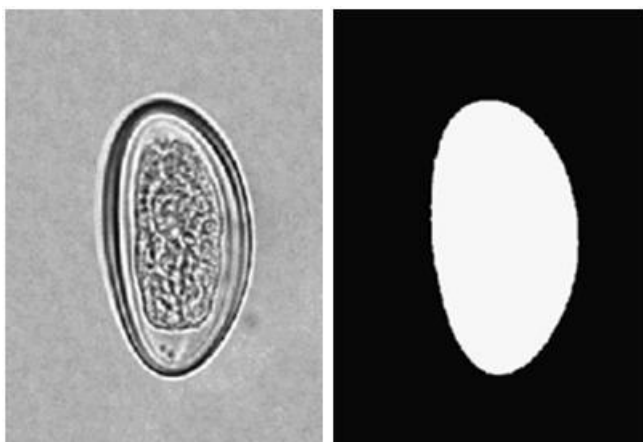
en la técnica de momentos invariantes.



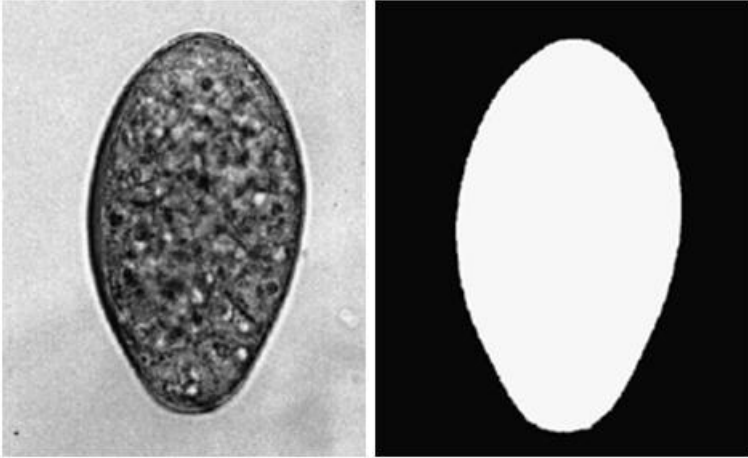
Ascaris lumbricoides infértil



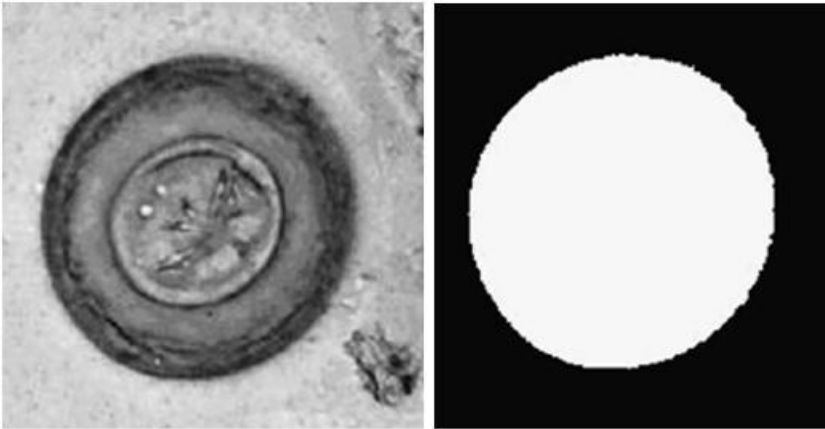
Diphyllobotrium Latum



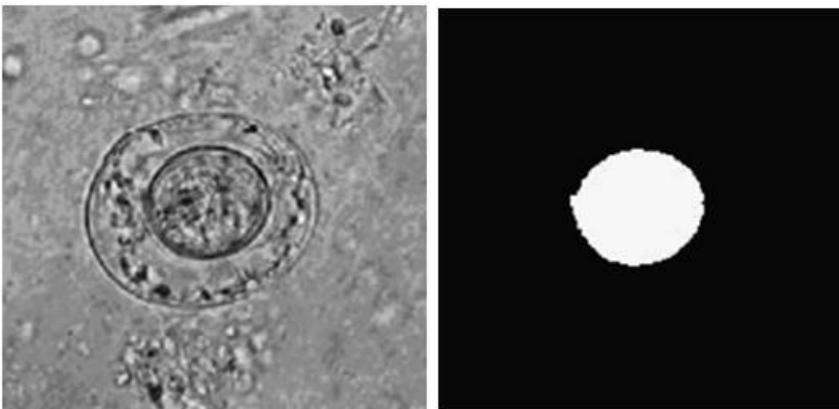
Enterobius vermicularis



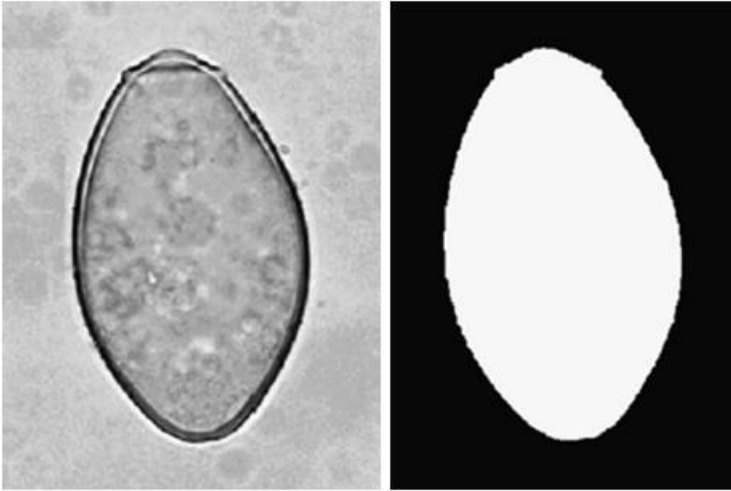
Fasciola hepática



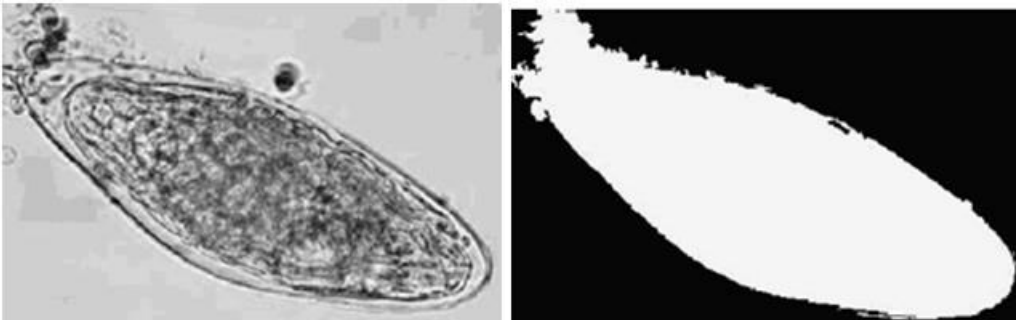
Hymenolepis diminuta



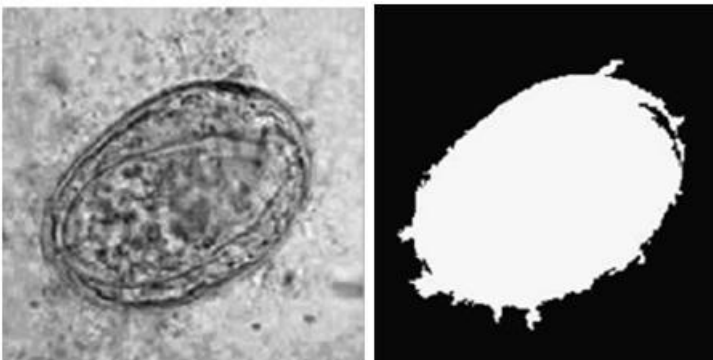
Hymenolepis nana



Kellicoti



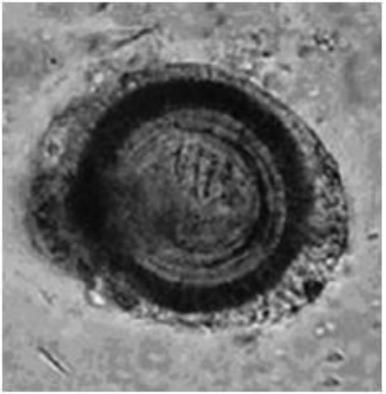
Schistosoma haematobium



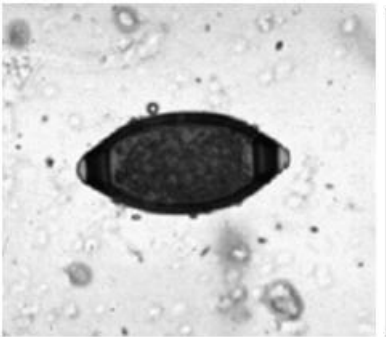
Schistosoma japonicum



Schistosoma mansoni



Taenia saginata



Trichuris trichiura

ANEXO 2. TÉCNICA NMX-AA-113-SEMARNAT-1999



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL

ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTO - MÉTODO DE PRUEBA

INTRODUCCIÓN

Ante la escasez de recursos hídricos, la explosión demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales es una importante alternativa como fuente adicional de suministro, particularmente para riego agrícola. Sin embargo, dicha actividad tiene implicaciones negativas desde el punto de vista sanitario, ya que representa un riesgo a la salud de los trabajadores agrícolas y de los consumidores de los productos, en especial cuando se trata de aquéllos que se consumen crudos como las hortalizas.

Los helmintos representan un elevado riesgo a la salud humana debido a que sus diversos estadios infecciosos (huevos embrionados o larvas) son altamente persistentes en el agua contaminada. Así, el agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales, sobre todo cuando ésta se emplea para el riego de cultivos.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la detección y enumeración de huevos de helminto en aguas residuales y lodos, con el fin de evaluar la calidad del agua y la eficiencia de los sistemas de tratamiento de la misma.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

NOM-001-ECOL-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.

NOM-003-ECOL-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de septiembre de 1998.

NMX-AA-003-1980 Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.

NMX-BB-014-1973 Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorio. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de agosto de 1973.

NMX-CC-013-1992 Criterios generales para la operación de los laboratorios de pruebas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de junio de 1992.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:
3.1 Aguas residuales

Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas.

3.2 Coagulación

Es la adición de compuestos químicos para alterar el estado físico de los sólidos coloidales o suspendidos, a fin de facilitar su remoción por sedimentación o filtración.

3.3 Filtración

Es la remoción de las partículas suspendidas de un líquido que fluye a través de un medio de porosidad adecuada.

3.4 Flotación

Es la técnica de concentración donde las partículas de interés permanecen en la superficie de la solución cuya densidad es mayor. Por ejemplo, la densidad de huevos de helminto se encuentra entre 1,05 y 1,18, y la de los líquidos de flotación se sitúa entre 1,1 y 1,4.

3.5 Helmintos

Término designado a un amplio grupo de organismos que incluye a todos los gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales) y de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, y sus ciclos de vida comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no y la alternancia compleja de generaciones que incluye hasta tres huéspedes diferentes.

3.6 Método bifásico

Es la técnica de concentración que utiliza la combinación de dos reactivos no miscibles entre sí, y donde las partículas (huevos y detritus) se orientan en función de su balance hidrofílico-lipofílico.

3.7 Sedimentación

Es el proceso físico de separación entre dos fases debido a la diferencia de sus densidades.

4 PRINCIPIO

Este método de análisis se basa en la diferencia de densidades entre los huevos de helminto, las demás sustancias presentes en las aguas residuales, y las que se agregan para permitir la separación. El método comprende los procesos de coagulación, sedimentación, flotación, decantación y la técnica bifásica para recuperar los huevos de helminto y efectuar el conteo.

5 MUESTREO

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de la calidad del agua, por lo cual, éste debe efectuarse como se menciona a continuación y de acuerdo a lo establecido en las normas mexicanas NMX-AA-003 y NMX-BB-014 (ver 2 Referencias):

5.1 Preparar garrafones de plástico inerte de 8 L, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 10 % (NaClO)

5.2 Lavarlos con agua potable a chorro y enjuagarlos varias veces con agua destilada.

5.3 Se toman muestras de 5 L (volumen total), en estos garrafones de plástico inerte, los cuales deben ser cerrados y sellados.

6 REACTIVOS Y MATERIALES

6.1 Reactivos (grado analítico)

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- Alcohol etílico (C_2H_5OH);
- Agua destilada;
- Cloruro de sodio (NaCl);
- Éter etílico;
- Formaldehído al 4 %;
- Hipoclorito de sodio (NaClO) (no aplica grado analítico), y
- Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

6.2 Materiales

- Aplicadores de madera;
- Barras magnéticas;
- Bulbo de goma;
- Espátula;
- Garrafones de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 8 L de capacidad;
- Gradillas para tubos de centrífuga de 50 ml;

- Guantes de látex;
- Mascarilla contra gases y vapores;
- Matraz Kitazato;
- Pipetas de 10 ml de plástico;
- Probetas graduadas de 50 ml y de 1 000 ml;
- Recipientes de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 2 000 ml y 4 000 ml de capacidad;

- Tamiz de 160 μm (micras) de poro;
- Tubos de centrífuga de 200 ml, 450 ml o de mayor volumen según sea la capacidad máxima de la centrífuga;
- Tubos de centrífuga cónicos de 50 ml, y
- Vasos de precipitados de 1 000 ml.

NOTA- Los materiales utilizados deben cumplir con lo establecido en la norma mexicana NMX-BB-014 (ver 2 Referencias).

7 APARATOS

- Agitador de tubos, con control de velocidad y adaptable a diversos tubos;
- Balanza granataria;
- Balanza analítica;
- Bomba de vacío con control de velocidad de succión;
- Campana de extracción;
- Celda de Sedgwich-Rafter o cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer;
- Centrífuga. Capaz de mantener los intervalos de operación de 1 000 r/min a 3 000 r/min o su equivalente en **g**;
- Densímetro (Hidrómetro). Capaz de mantener el intervalo de medición de 1,0 g/ml a 1,4 g/ml, y temperatura de operación de 0°C a 4°C;
- Incubadora;

- Microscopio óptico. Equipado para hacer iluminación campo claro (Köheler), con aumento de 10 a 100x y platina móvil (opcional);
- Parrilla con agitación magnética, y
- Refrigerador.

8 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

- 8.1 Las muestras deben mantenerse a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su llegada al laboratorio.
- 8.2 La muestra debe procesarse dentro de las 48 h después de su toma, o en caso contrario, debe fijarse con 10 ml de formaldehído al 4 %, o bien, preservarse en refrigeración para realizar su análisis antes de 2 meses.

9 PROCEDIMIENTO

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos obtenidos.

9.1 Preparación de soluciones

9.1.1 Solución de sulfato de zinc (ZnSO_4) con gravedad específica de 1,3

Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 1 000 ml de agua destilada; mezclar en la parrilla magnética hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro. Ajustar la densidad a 1,3 agregando sulfato de zinc o agua destilada, según sea el caso.

9.1.2 Solución de alcohol-ácido.

Homogeneizar 650 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N, con 350 ml de alcohol etílico. Almacenar la solución en un recipiente hermético.

9.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos utilizados deben ser calibrados con patrones certificados o ajustados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

9.3 Seguridad

Durante el procesado de la muestra se debe utilizar guantes de látex y cubreboca para evitar cualquier riesgo de infección.

Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

Cuando se efectúe la agitación de las soluciones con éter, ésta se debe realizar en sitios ventilados o dentro de la campana de extracción, y considerar su inflamabilidad. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa, ya que es un reactivo sumamente tóxico.

9.4 Manejo de residuos

Todo material desechado debe ser previamente esterilizado o desinfectado con hipoclorito de sodio al 10%.

9.5 Concentración y separación de los huevos de helminto

La recuperación de los huevos de helminto de la muestra se debe realizar efectuando los siguientes pasos:

- a) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- b) Aspirar y desechar el sobrenadante por vacío y sin agitar, si la sedimentación (separación) se realizó por centrifugación, decantar lentamente. Filtrar el sedimento en el tamiz de 160 μm de poro. Lavar el tamiz con 5 L de agua (potable o destilada), y recuperar el agua de lavado junto con el sedimento filtrado.
- c) Colocar el filtrado y el agua de enjuague en el garrafón de 8 L donde originalmente se encontraba la muestra o en los recipientes utilizados en la centrifugación.
- d) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- e) Aspirar con cuidado el sobrenadante al máximo y desecharlo. Depositar el sedimento en los recipientes para la centrífuga. Enjuagar 3 veces el garrafón perfectamente con poca agua destilada, y colocar en los recipientes para centrifugación.

- f) Centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.

- g) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío. Asegurarse que en el fondo del recipiente exista la pastilla; en caso contrario, centrifugar nuevamente. Resuspender la pastilla en 150 ml de la solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$). Homogeneizar la pastilla con el agitador de tubos o con un aplicador de madera.

- h) Una vez más, centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min, y recuperar el sobrenadante vertiéndolo en un recipiente de plástico de 2 000 ml. Diluir cuando menos en 1 000 ml de agua destilada, y dejar sedimentar al menos 3 h, o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.

- i) Aspirar con cuidado y al máximo el sobrenadante por vacío, y resuspender el sedimento por agitación, utilizando poca agua destilada. Vertir la suspensión resultante en un tubo de centrífuga de 200 ml, incluyendo el agua de enjuague del recipiente y centrifugar a 480 **g** durante 3 min.

- j) Decantar nuevamente el sobrenadante y resuspender la pastilla con agua destilada en un tubo de 50 mL y centrifugar a 480 **g** durante 3 min.

- k) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío y resuspender la pastilla en 15 ml de la solución de alcohol-ácido por medio de un agitador de tubos, y agregar 10 ml de éter. Agitar suavemente y de vez en cuando destapar cuidadosamente los tubos para dejar escapar el gas que se desprenda. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción

- l) Centrifugar una última vez a 660 **g** durante 3 min.

- m) Aspirar al máximo el sobrenadante, dejando menos de 1 ml del mismo y evitando la pérdida de la pastilla; homogeneizar la pastilla, y proceder a la cuantificación. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción.

9.6 Cuantificación de los huevos de helminto

- a) Para evitar la sobreposición de las estructuras y el detritus no eliminado, repartir la muestra en volúmenes de 0,5 ml a 1,0 ml, con el fin de facilitar la lectura.

- b) Distribuir cada uno en una celda de Sedgwich-Rafter, o bien, en una cámara de conteo de Doncaster o cámara Neubauer.

- c) Identificar visualmente una a una las estructuras, anotando los generos identificadas con ayuda de la figura de los huevos vista a continuación.

10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

10.1 Cálculos

Para determinar las revoluciones por minuto (rev/min) de la centrifuga, se utiliza la fórmula siguiente:

$$\text{rev/min} = \sqrt{Kg/r}$$

donde:

g es la fuerza relativa de la centrifugación;

K es la constante cuyo valor es 89,456, y

r es el radio de la centrifuga en centímetros (cm).

La fórmula para calcular **g** es la siguiente:

$$g = r(\text{rev/min})/K$$

10.2 Expresar el resultado en número de huevecillos por litro, tomando en consideración la expresión en cálculos, o bien expresar el número de huevos contados y el volumen analizado:

$$HL = \frac{H}{5}$$

donde:

H es el número de huevos leídos en la muestra;

HL es el número de huevos por litro, y

5 es el volumen de la muestra.

10.2 Interferencias

La sobreposición de estructuras y/o detritus no eliminado en el sedimento, puede dificultar su lectura. En tal caso, es importante dividir el volumen en las alícuotas que se consideren necesarias. La falta de experiencia en la identificación de especies es también un elemento decisivo en el conteo y sobreconteo.

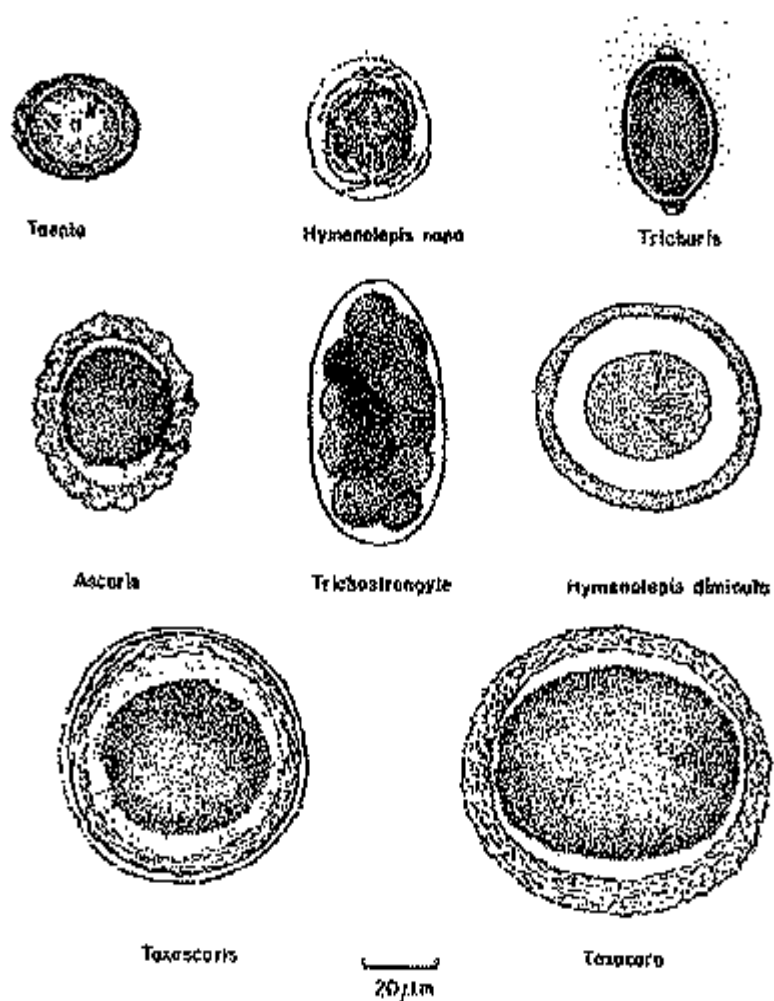


FIGURA 1.- Especies de huevos de helminto

11 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba debe incluir lo siguiente

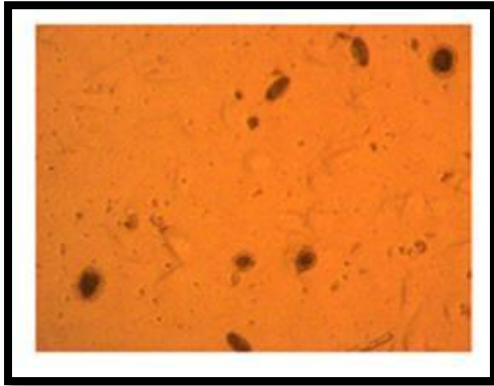
- Todos los detalles necesarios para la identificación completa de la muestra;
- Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el punto 10, y
- Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

MÉXICO, D.F.

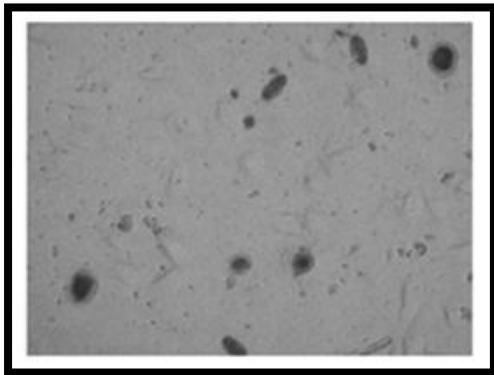
LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS.

CARMEN QUINTANILLA MADERO.

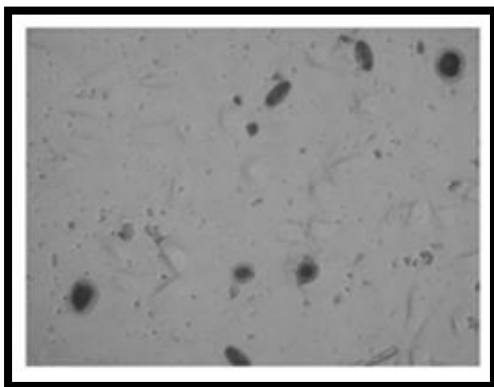
ANEXO 3. PRIMERAS PRUEBAS DEL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES



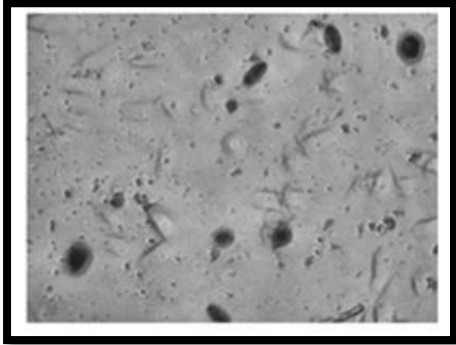
Entrada de la imagen



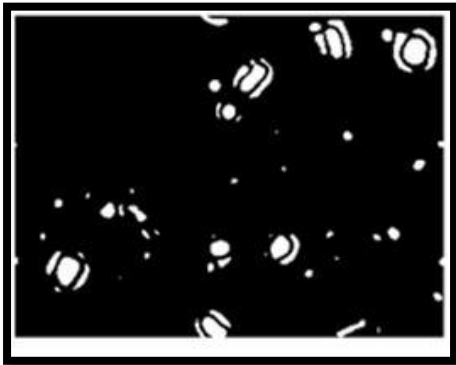
Escala de gris, en la que se simplifica la imagen.



Filtro de mediana, se suaviza la imagen para quitar impurezas.



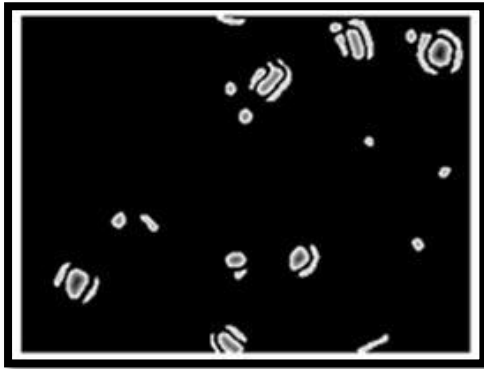
Ajuste de contraste, para eliminar las variaciones en la iluminación.



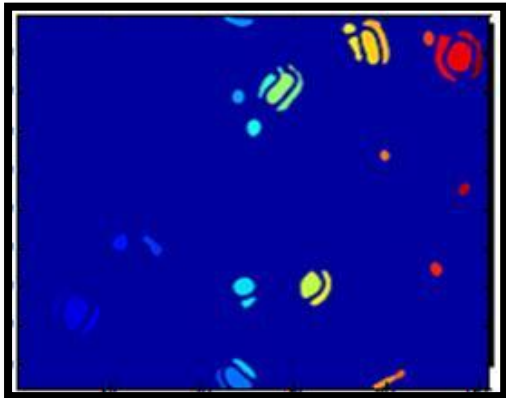
Detección de objetos por los bordes en los que el algoritmo los detecta.



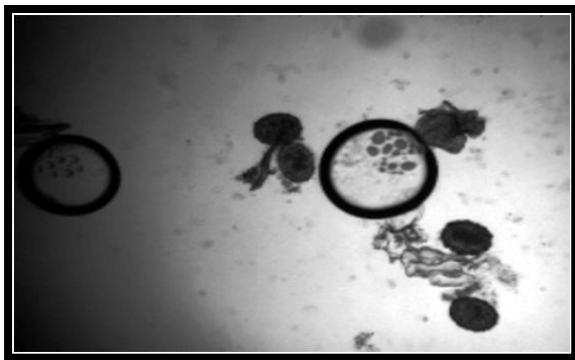
Eliminación de objetos pequeños.



Transformada de distancia en donde se le asigna un número a cada objeto.



Transformada de vertientes, en donde se enlistan los objetos para poder identificarlos.



Huevos de *A. lumbricoides* con filtrado y ecualización de histograma.

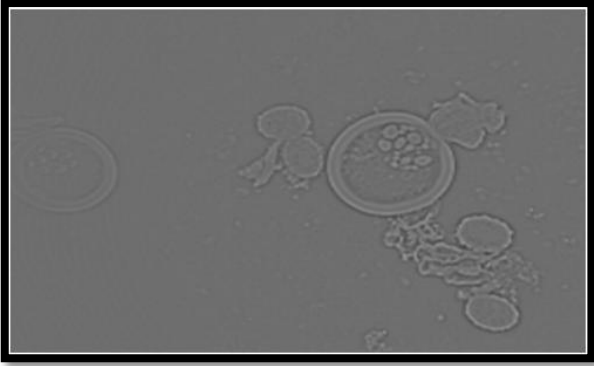
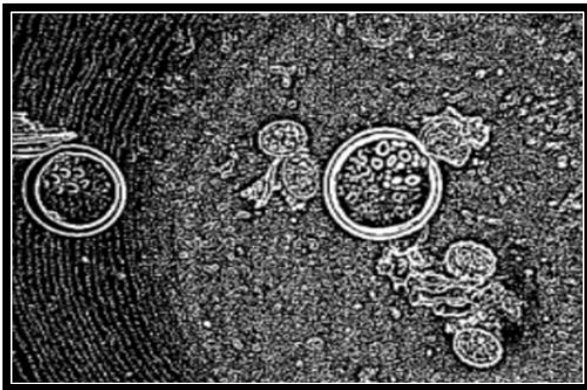


Imagen anterior de Huevos de *A.*

lumbricoides con un Filtro LoG.



Misma imagen de Huevos de *A.*

lumbricoides detectando umbrales.

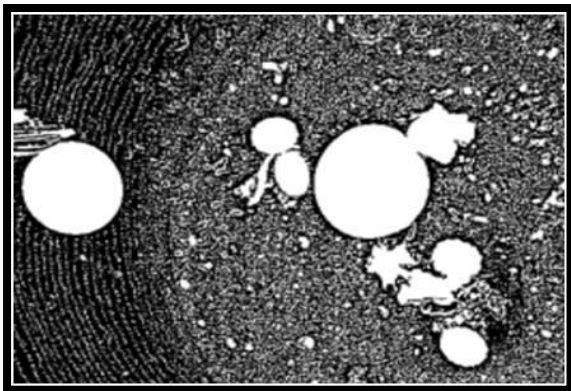
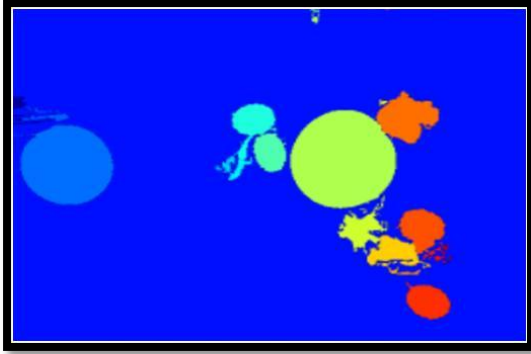


Imagen de Huevos de *A. lumbricoides* con

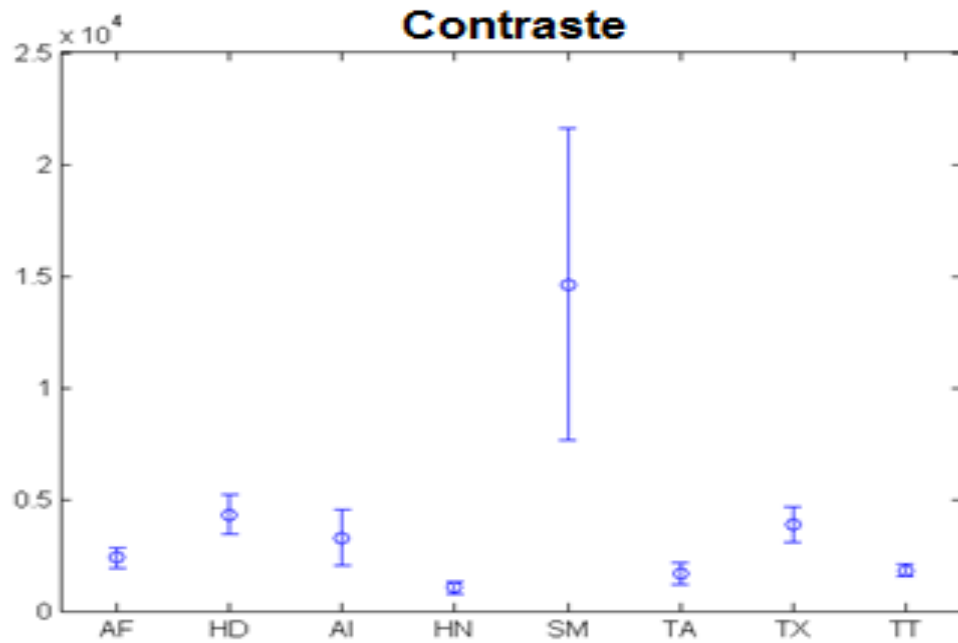
relleno de espacios



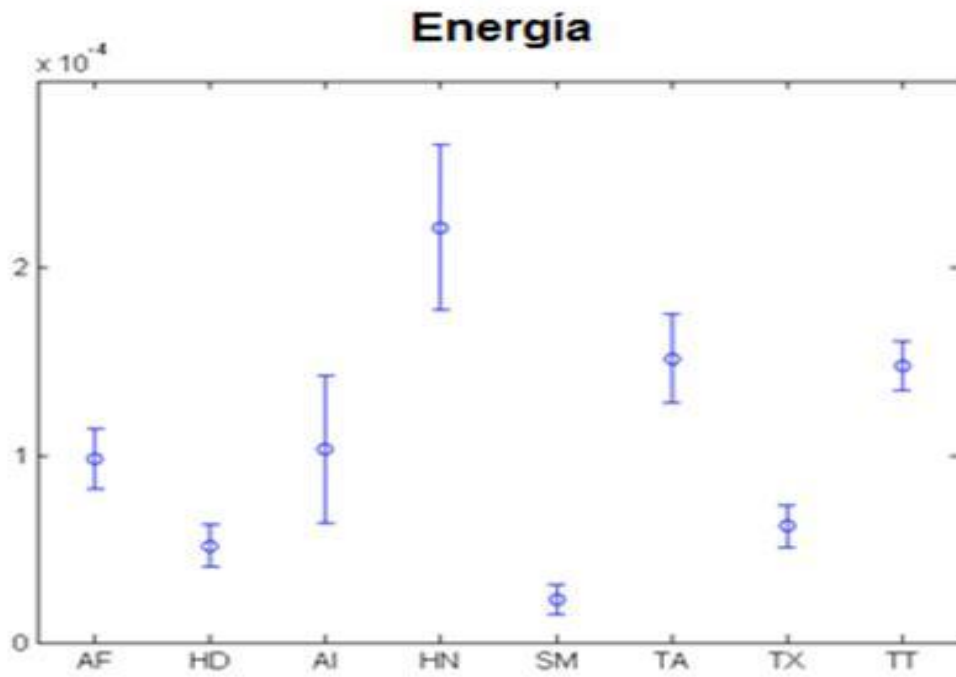
Etiquetado de objetos, etapa final del procesamiento de la imagen. Huevos de *A. lumbricoides*.

ANEXO 4. PRIMER CALCULO DE CARACTERISTICAS DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS

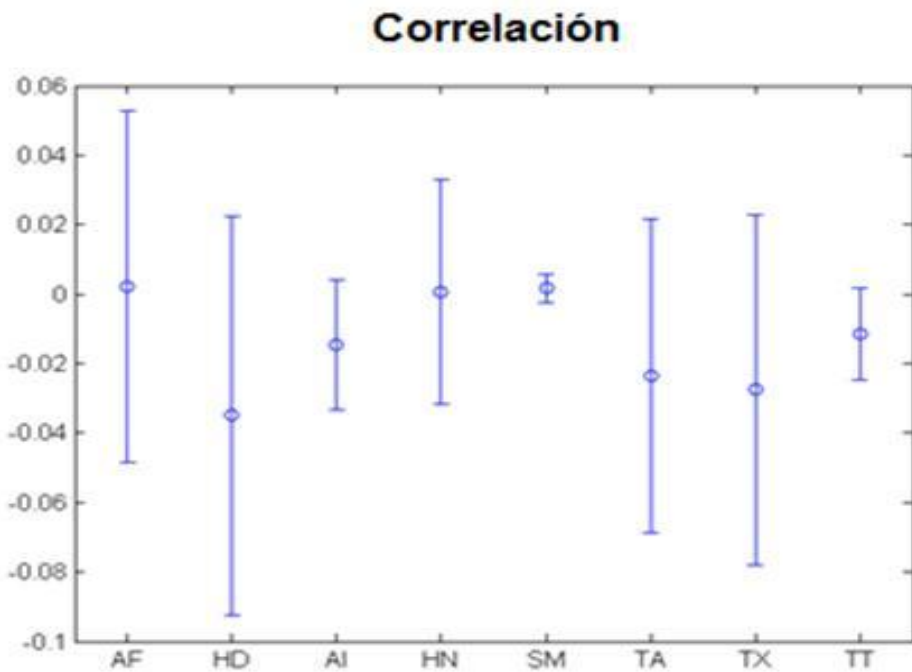
	Área	Perímetro	Excentricidad	Eje mayor	Eje menor	Compacidad
<i>A. lumbricoides</i>	14162.3158	545.0238	0.5685	150.7438	121.9944	1.66911735
<i>Taenia</i> sp.	6967.2667	393.3177	0.5578	105.5755	86.7597	1.76691087
<i>T. trichiura</i>	6873.9000	457.6700	0.8454	131.8800	69.4500	2.42488874
<i>H. diminuta</i>	28114.5000	743.4375	0.3847	200.1192	181.3381	1.56440301
DESVIACIONES ESTANDAR						
	Área	Perímetro	Excentricidad	Eje mayor	Eje menor	
<i>A. lumbricoides</i>	2036.2233	118.0005	0.1013	15.1323	9.2041	0.54416708
<i>Taenia</i> sp.	1361.8379	72.0896	0.0792	11.6153	8.2089	0.30367531
<i>Toxocara cati</i>						
<i>H. nana</i>						
<i>T. trichiura</i>	692.5800	94.9100	0.0360	12.2400	5.2100	1.03500902
<i>H. diminuta</i>	4138.6022	190.1527	0.1359	21.6469	13.0337	0.69525087

ANEXO 5. PRIMERAS GRÁFICAS DEL CÁLCULO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS

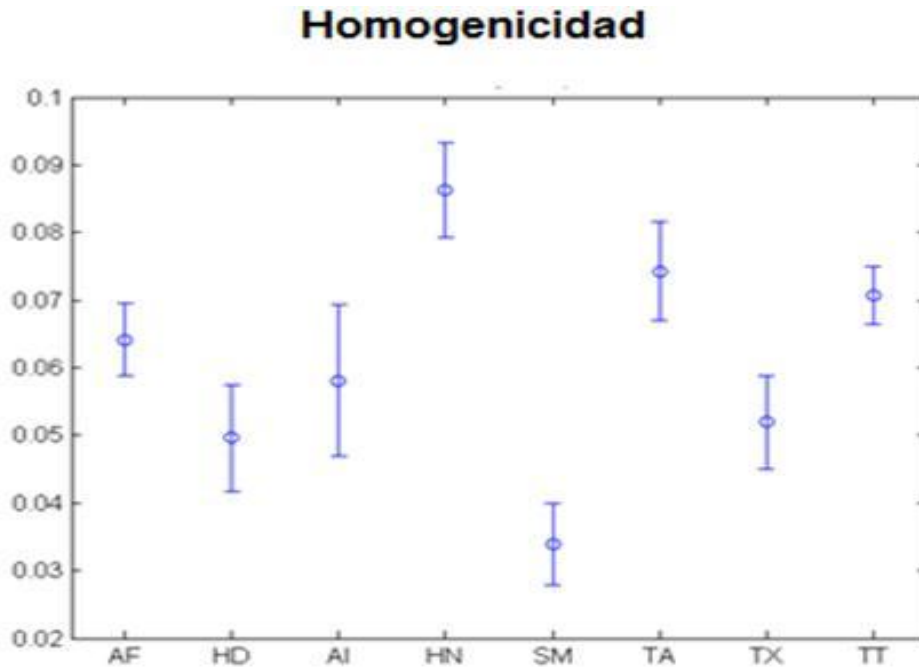
Histograma en donde se muestra el contraste para el cálculo de la textura del objeto.



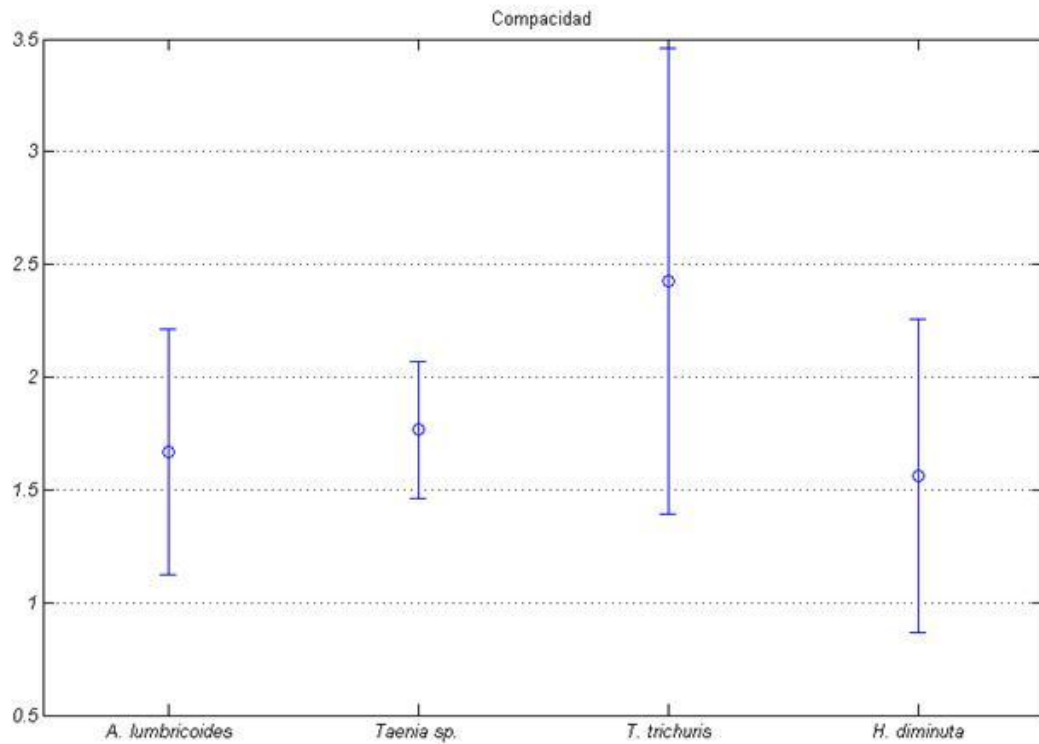
Histograma en donde se muestra la energía para el cálculo de la textura del objeto, nótese el solapamiento entre las especies.



Histograma en donde se muestra la correlación para el cálculo de la textura del objeto, es inminente la relación entre todas las especies de huevos de helmintos con esta característica.



Histograma en donde se muestra la homogenicidad para el cálculo de la textura del objeto.



Gráfica de identificación por compacidad de las especies de huevos de helminto. Esta característica muestra que no es relevante para poder diferenciar a las especies

ANEXO 6 TIPOS DE AGUA RESIDUAL

	<i>Aif</i>	<i>Ali</i>	<i>TX</i>	<i>TT</i>	<i>TA</i>	<i>HD</i>	<i>HN</i>	<i>SM</i>	Total Tabla 9. Agua tipo I huevos/muestra
1	0	0	0	0	0	0	0	1	
2	0	0	1	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	1	0	0	
4	0	0	1	0	0	0	1	0	
5	0	0	0	0	0	0	1	0	
6	1	0	0	0	0	1	0	0	
7	0	0	2	0	0	0	1	0	
8	0	0	2	1	0	1	0	0	
9	1	0	0	2	0	0	0	0	
10	2	0	1	0	0	1	0	0	
11	0	0	1	0	0	1	0	1	
12	3	1	1	0	0	2	2	0	
13	1	1	1	0	0	0	0	1	
14	1	0	0	0	0	0	2	0	
15	0	0	1	0	0	0	1	1	
16	0	0	3	3	0	2	0	0	
17	2	0	1	0	0	2	0	0	
18	0	0	2	0	0	1	0	1	
19	1	0	1	1	0	0	2	0	
20	0	0	0	1	0	0	1	1	
21	0	0	0	1	0	0	1	0	
22	1	0	0	0	1	0	0	0	
23	2	0	0	0	1	0	0	0	
24	0	0	0	0	1	0	0	0	
25	0	0	0	0	3	0	0	0	
26	0	1	0	0	0	0	0	0	
27	0	1	0	0	0	0	0	0	
28	0	0	1	0	1	0	0	0	
29	0	0	0	0	1	0	0	0	
30	1	0	0	0	1	0	0	1	
31	0	0	0	0	1	0	0	0	
32	0	0	0	0	4	0	0	0	

agua tipo 2

	<i>Alf</i>	<i>Ali</i>	<i>TX</i>	<i>TT</i>	<i>TA</i>	<i>HD</i>	<i>HN</i>	<i>SM</i>	Total Tabla 9. Agua tipo I huevos/muestra
1	8	0	3	0	1	0	0	0	0
2	4	1	2	0	0	1	0	0	0
3	4	0	1	0	2	0	0	0	0
4	1	1	2	0	0	1	1	0	0
5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	2	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	0	0	0	0	1
9	3	0	1	0	0	1	0	0	0
10	3	0	0	0	0	2	0	0	0
11	3	1	2	0	0	0	0	0	0
12	4	1	1	0	0	0	0	0	0
13	6	1	1	0	0	0	0	0	0
14	10	1	1	1	0	0			0
15	0	0	0	2	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	0	0	1	0	0
17	5	0	0	1	0	0	1	0	0
18	0	0	0	0	0		0	0	nulo
19	7	0	2	0	1	0	0	0	0
20	3	0	1	0	1	0	1	0	0
21	1	1	0	0	0	0	0	0	0
22	2	0		0	0	0	0	0	0
23	3	0	1	0	0	0	1	0	0
24	0	1	1	0	1	1	0	0	0
25	1	1	0	0	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	2	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0	0	1
28	1	1	0	0	0	0	0	0	1
29	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	0	1	0	0	0	0	0
31	0	1	0	0	0	0	0	0	0
32	6	0	0	0	1	1	0	0	0
33	3	0	1	1	0	1	0	0	1
34	1	0	1	1	0	1	0	0	1
35	1	0	3	0	0	0	1	0	0
36	1	0	3	1	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	1	0	0

38	4	0	0	0	0	1	0	0
39	1	0	0	0	1	2	1	0
40	4	0	0	0	0	0	1	0
41	6	0	1	0	0	0	1	0
42	4	0	1	0	0	0	1	1
43	5	0	2	0	0	0	2	1
total	109	11	31	10	12	12	13	10

208

agua tipo 3

	<i>Aif</i>	<i>Ali</i>	<i>TX</i>	<i>TT</i>	<i>TA</i>	<i>HD</i>	<i>HN</i>	<i>SM</i>	Total Tabla . Agua tipo I huevos/muestra
1	6	0	1	1	0	1	0	0	
2	1	0	0	0	0	1	0	0	
3	4	0	1	0	0	0	0	0	
4	4	1	2	0	0	0	0	0	
5	4	0	1	0	0	0	0	0	
6	5	0	1	0	0	0	0	0	
7	1	0	1	0	1	2	0	0	
8	2	0	1	1	0	0	0	0	
9	7	0	1	1	0	0	0	0	
10	4	0	1	0	1	1	0	0	
11	2	0	0	0	1	1	0	0	
12	3	0	0	1	0	0	0	0	
13	3	0	3	0	1	0	0	0	
14	2	0	0	0	0	2	0	0	
15	1	0	0	0	1	1	0	0	
16	4	0	0	0	0	1	1	0	
17	2	0	2	1	0	0	0	0	
18	0	0	2	1	0	1	0	0	
19	3	0	1	0	1	1	0	0	
20	5	0	0	0	1	0	0	0	
21	5	0	2	1	2	0	0	0	
22	2	0	1	0	0	1	0	1	
23	0	0	0	1	0	0	1	1	
24	2	0	2	0	0	1	0	1	
25	3	0	0	1	0	1	1	0	
26	3	0	2	1	0	2	0	0	
27	3	0	0	0	1	0	0	0	
28	5	0	1	1	0	1	0	0	
29	4	2	1	0	0	0	0	0	
30	3	0	0	0	1	0	1	0	

31	3	0	1	0	0	1	1	0
32	4	2	1	0	0	0	0	0
33	2	1	1	0	0	0	0	0
34	10	1	0	0	2	0	0	0
35	7	0	0	0	3	2	1	0
36	8	0	0	0	0	1	1	0
37	10	0	0		2	1	1	0
38	0	1	0	0	0	0	0	0
39	2	1	0	0	1	0	0	0
40	7	0	0	0	2	1	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	1
42	1	1	2	0	0	0	0	0
43	1	1	1	0	0	0	0	0
44	6	1	0	0	0	2	0	0
45	6	2	0	0	0	1	0	0
46	6	0	1	0	0	0	1	0
47	3	0	0	0	0	1	1	0
48	0	0	0	0	0	0	0	1
49	0	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	0	0	0	0	1
51	1	0	0	0	0	0	0	1
52	0	0	0	0	0	0	0	1
53	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	170	14	34	11	21	28	10	10

**ANEXO 7. IMÁGENES POST-PROCESAMIENTO DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS
(SOFTWARE DESARROLLADO).**



