

稀疏图像内容情况下显微镜自动聚焦算法*

翟永平¹⁺, 刘云辉², 周东翔¹, 刘 顺³

¹(国防科学技术大学 电子科学与工程学院, 湖南 长沙 410073)

²(香港中文大学 机械与自动化工程系, 香港)

³(国防科学技术大学 常州超媒体与感知技术研究所, 江苏 常州 213016)

Autofocusing Method for Microscopy with Low Image Content Density

ZHAI Yong-Ping¹⁺, LIU Yun-Hui², ZHOU Dong-Xiang¹, LIU Shun³

¹(College of Electronics Science and Engineering, National University of Defense Technology, Changsha 410073, China)

²(Department of Mechanical and Automation Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

³(Changzhou Institute of Supermedia and Sensing Technology, National University of Defense Technology, Changzhou 213016, China)

+ Corresponding author: E-mail: talkshow88@gmail.com

Zhai YP, Liu YH, Zhou DX, Liu S. Autofocusing method for microscopy with low image content density.

Journal of Software, 2012, 23(5): 1281-1294. <http://www.jos.org.cn/1000-9825/4099.htm>

Abstract: Auto-Focusing is one of the key issues in automatic microscopy. The traditional gradient based auto-focusing algorithms may fail to find the optimal focal plane under the circumstances with low image content density because the slope variation of the focus measure of low content density images is small, and the global maximum may be drowned in noises. This paper proposes a content importance factor based focus measure for guiding automatic search of the optimal focal plane with low image content density. The proposed method classifies the pixels into three types: the content pixels, the debris pixels, and the background pixels, according to the relative variation of gradient magnitude of current image and the reference image captured at different z -axis positions from the same scene and adaptively assigns different weights to pixels based on the image content in the focus measure computation. In this way, the contribution of the content pixels is emphasized while that of debris pixels and background pixels is suppressed, and thus, the steepness of the focus curve around the optimal point is improved. The experimental results show that performance of the proposed method is far superior to the traditional methods: the auto-focusing success rate of the proposed method is larger than 90% under the circumstances with low image content density while the traditional method only gains a success rate of 24%.

Key words: auto-focusing; microscopy; focus function; image content density; content importance factor

摘 要: 自动聚焦是全自动显微成像中的关键技术.为了解决在极低内容密度(稀疏内容)情况下传统聚焦方法无法成功找到焦平面的问题,提出一种基于图像内容重要度加权的聚焦函数增强算法.该算法利用聚焦过程中当前图像和参考图像中对应像素沿光轴方向的梯度变化规律对像素进行分类,并根据不同像素对图像清晰程度判决的贡

* 基金项目: 国家自然科学基金(60975023)

收稿时间: 2011-01-05; 定稿时间: 2011-07-29; jos 在线出版时间: 2011-12-29

CNKI 网络优先出版: 2011-12-29 16:54, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2560.TP.20111229.1654.001.html>

献大小自适应调整当前像素的重要度因子,通过这种方式增强了图像内容像素的计算权重并有效抑制了镜头杂质及背景噪声,极大地增强了聚焦曲线的陡峭度.在此基础上,采用图像分块的方式来克服显微镜 Z 轴机械系统误差对算法性能的影响并降低算法复杂度.实验结果表明,在图像内容非常稀疏的情况下,该算法的聚焦成功率高达 90%,而传统聚焦算法的成功率仅为 24%.

关键词: 自动聚焦;显微镜;聚焦函数;图像内容密度;内容重要度因子

中图法分类号: TP391 **文献标识码:** A

自动聚焦是全自动显微成像中的一项关键技术,由于显微镜景深一般比较小,比如采用 100 倍物镜、数值孔径为 1.25 时,其景深一般小于 $1\mu\text{m}$,因此聚焦精度要求比较高,基于测距原理的主动式聚焦由于受机械系统运动误差的影响,一般无法满足要求^[1,2].因此在显微镜自动聚焦中,一般采用基于图像处理的被动式聚焦方式,这种方式不依赖于任何测距设备,仅利用已获取的序列数字图像分析当前系统的聚焦状态,并按照一定的搜索策略控制电机反复调节镜头或载物台位置,直到获取最清晰的图像.这种聚焦方式最关键的是图像聚焦状态的判断,目前比较成熟的方法是基于聚焦函数的方法(也称为聚焦深度法(depth from focus)).根据傅里叶光学成像原理,离焦图像可以看成是聚焦图像跟特定的点扩散函数(point spread function)的卷积结果,图像的离焦过程可以看成是对聚焦图像不断进行低通滤波的过程,因此聚焦图像一般表现为细节清晰,其梯度幅值也相对比较大;在频域则表现为其高频分量丰富,而离焦图像则比较模糊,其梯度幅值比较小,在频域其高频分量也相对较少.基于以上原理,很多学者提出了各种各样的聚焦函数,比如灰度差分函数、SML 函数^[3]、Tenengrad 函数^[4]、Brenner 函数^[5]、基于小波变换的函数^[6-8]等.这些函数的主要目的就是统计图像的梯度或高频分量,用序列图像的梯度或高频分量值的比较结果来判断当前图像的聚焦状态,这些函数的具体性能评估可见参考文献[1,9-15].在一般的应用中,这些函数基本上能够满足要求,但是在某些情况下,比如当图像内容比较少、噪声影响比较大时,这些函数曲线非常平坦,而且存在非常多的局部极值,最大值也不显著,这往往会导致自动聚焦的失败.在以往的研究中,很多学者都是针对特定的图像进行聚焦函数的研究及性能的评估,而忽视了图像内容的多寡对聚焦函数性能的影响.虽然也有学者注意到了这个问题^[12],但是没有给出解决此问题的有效方法.实际上,聚焦函数的性能不仅取决于函数本身,还与图像内容的多寡有密切的关系.对同一个聚焦函数,当图像中内容比较丰富时,聚焦函数曲线比较陡峭,最大值非常显著;而当图像内容比较少时,其最大值往往是不显著的,甚至会淹没在噪声中而无法找到真实的焦平面.图 1 给出了 3 幅图像,这 3 幅图像分别来自不同的图像序列,它们的内容丰富程度有较大区别,当同一个聚焦函数(这里采用性能比较好的 Tenengrad 函数)应用在这 3 个不同的图像序列时,其聚焦函数曲线形态差异非常大(如图 1(d)所示).显然,对图像内容极少(图 1(c)所示)的图像序列,其聚焦函数曲线非常平坦,最大值淹没在噪声中,在这种情况下,采用传统聚焦方法是很难成功聚焦的.

目前,有学者提出通过选取图像中特定聚焦区域的方式增加聚焦曲线的陡峭程度,从而提高自动聚焦的成功率并减少计算量.典型的有中心取窗法^[15]、多点取窗法^[15]、非均匀采样法^[16,17]、基于图像边缘一阶矩的区域选取算法^[18]等.这些方法首先假设图像中感兴趣目标出现的位置是提前预知的^[15]或按照一定规律分布的^[16],或可以通过边缘检测及图像分割的方式获取感兴趣目标在图像中的位置^[18].这些方法在数码相机等大景深系统及可提前预知目标在图像中出现的区域范围的情况下可以取得很好的效果,但是在小景深系统(尤其是显微镜系统中)及无法提前预知图像中目标出现范围的情况下,这种方式是无效的:首先,在显微图像获取中,我们往往无法提前预知感兴趣目标出现的位置,也就无法提前预设聚焦窗口;其次,当远离焦平面时,图像一片模糊,无法通过图像分割等手段获取目标区域,也就无法确定聚焦区域,这在显微镜等小景深系统中显得尤为突出;最后,镜头及 CCD 传感器表面附着的灰尘及噪声的影响,在高放大倍数的系统中,镜头及 CCD 传感器表面灰尘对成像的效果影响非常大,无论是清晰图像还是离焦图像,当光学系统上存在灰尘时(这在绝大多数情况下是存在的),图像中都会表现出来,这将严重破坏聚焦函数的性能.因此,这种区域选取的办法在显微镜自动聚焦中无法应用,必须寻找其他解决办法.

分析传统的聚焦函数可以发现,这些函数实际上是将某种聚焦算子应用到该图像中的每个像素,从而获取

某种聚焦测度,然后将这些聚焦测度取平均值以获取整幅图像的聚焦函数值.这意味着传统的聚焦函数将图像中的每个像素同等对待,而无论像素本身所具有的特性.而基于选取聚焦窗口的算法,其本质上是聚焦窗口内的像素同等对待,而在窗口外的像素则不予考虑.这种处理方式与传统的处理方式本质上是一致的,因而也无法从根本上解决稀疏内容情况下的自动聚焦问题.本文通过分析显微镜自动聚焦过程中不同离焦深度图像中的对应像素(即具有相同的图像平面坐标,但在不同 z 轴位置获取的图像像素)的梯度变化规律得出:在自动聚焦过程中,处于不同空间位置的像素,其沿着 z 轴的梯度变化规律存在显著差异.由于聚焦函数是基于梯度分析的,由此得出处于不同空间位置的像素对图像聚焦状态的贡献程度也是不同的:那些在聚焦过程中沿着 z 轴梯度变化剧烈的像素对图像聚焦状态的贡献比较大,我们将这类像素称为内容像素;而那些梯度变化比较平缓的像素对图像聚焦状态的意义不大,这类像素称为无效像素.为了表征某个特定像素对图像聚焦状态判断的重要程度,我们提出内容重要度的概念,某个像素的重要度越大,其对聚焦过程的贡献就越大,反之则贡献越小.在此基础上,提出一种基于内容加权的聚焦函数增强算法,该算法依据图像中像素的重要度赋予该像素相应的计算权重,重要度越大,其计算权重越大.在稀疏内容情况下,虽然无效像素相对于内容像素而言数量比较多,但是其计算权重非常小,而内容像素则占据了很大的计算权重,因此,整幅图像的聚焦曲线仍然会有很大的陡峭度,这就从根本上解决了稀疏内容情况下传统聚焦函数无法找到焦平面的问题.

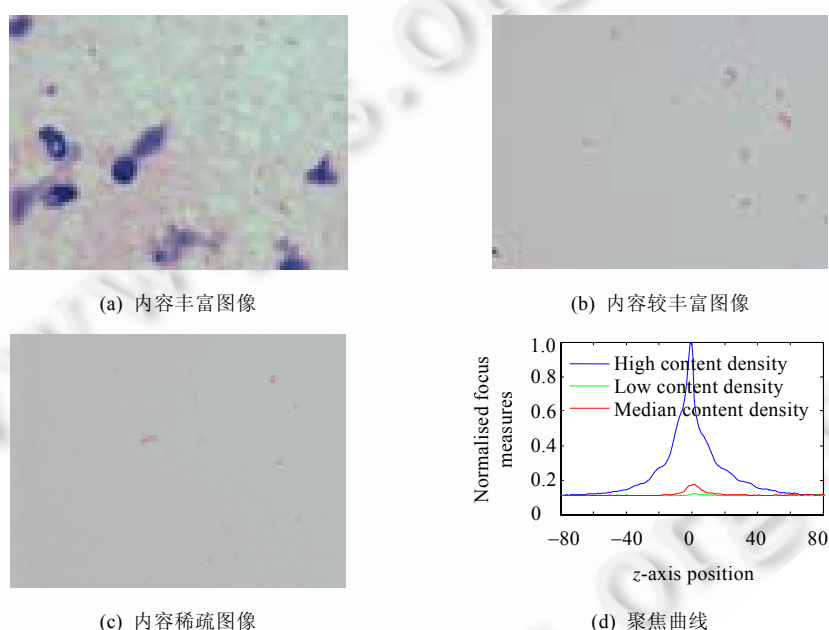


Fig.1 Effect of image content density on the slope of the focus curves

图1 图像内容密度对聚焦曲线陡峭程度的影响

1 基于梯度的聚焦函数分析

目前提出的聚焦函数非常多,这些函数可以分为3类:第1类是基于梯度的聚焦函数,这些函数通过计算图像在某种意义下的梯度幅值的统计量,然后比较不同离焦深度图像的梯度幅值统计量的大小关系,从而获取图像是否离焦的初步判断;第2类是基于频域的函数,这类函数一般通过傅里叶变换(或其他变换,如小波变换等)将图像转换到频域,通过分析图像高频分量,从而获取图像清晰度的某种评价;第3类是基于图像统计信息及自相关的聚焦函数,这类函数最典型的有方差函数、自相关函数、熵函数^[19]等.由于基于频域的评价函数计算较为复杂,在实际中应用并不多.目前应用最为广泛的是基于梯度的聚焦函数.这类函数计算简单、抗噪性较强,不同函数之间的区别主要体现在梯度计算方式的不同.基于梯度的聚焦函数值的计算过程可以归纳为3个步骤:

第1步,选取聚焦窗口,除非事先知道兴趣目标在图像中出现的位置,否则一般选取整幅图像作为聚焦窗口;第2步,计算单个像素的聚焦测度,实际上就是计算该像素点的梯度值或梯度值的某种变形.需要注意的是,梯度的计算方式非常多,这也是为什么目前聚焦函数种类繁多的原因;第3步,计算聚焦窗口内的总的聚焦测度,实际上就是计算聚焦窗口内所有像素点梯度的算术平均值.若图像大小为 $W \times H$,选取整幅图像作为聚焦窗口,则总的聚焦测度 F_t 为

$$F_t = \frac{1}{WH} \sum_{y=0}^{W-1} \sum_{x=0}^{H-1} f(x, y) \quad (1)$$

其中 $f(x, y)$ 代表 (x, y) 点处的聚焦测度值.下面给出几种典型的梯度类聚焦函数中单个像素点的聚焦测度计算公式(式中 $g(x, y)$ 代表图像在 (x, y) 点处的灰度值):

(1) 灰度差分绝对值

$$f_{smd}(x, y) = |g(x, y) - g(x, y - 1)| + |g(x, y) - g(x - 1, y)| \quad (2)$$

(2) Tenengrad 函数

$$f_{Tenengrad} = G_x^2(x, y) + G_y^2(x, y) \quad (3)$$

其中, $G_x(i, j)$ 和 $G_y(i, j)$ 分别为图像 x, y 方向的一阶 sobel 算子差分.

(3) 图像的拉普拉斯能量(EOL)

$$f_{eol} = [g(x-1, y) + g(x+1, y) + g(x, y-1) + g(x, y+1) - 4g(x, y)]^2 \quad (4)$$

(4) SML 函数

$$f_{sml} = [2g(x, y) - g(x-1, y) - g(x+1, y) + 2g(x, y) - g(x, y-1) - g(x, y+1)]^2 \quad (5)$$

(5) Brenner 函数

$$f_{Brenner} = |g(x, y) - g(x+2, y)|^2 \quad (6)$$

将以上这些函数带入公式(1),即可获取图像子在不同聚焦函数下的聚焦测度值.当图像内容丰富时,这些函数性能虽然各异,但基本满足聚焦要求;但是当图像内容比较少时,函数曲线会非常平坦,而且存在非常多的局部极值,最大值也不显著,最终导致自动聚焦的失败.其根本原因在于,采用公式(1)进行聚焦测度计算时,将图像中的每个像素或区域同等对待,而不考虑像素本身所具有的特性.实际上,在自动聚焦过程中,图像中不同的像素或区域对聚焦状态判断的影响存在很大差异,有些像素或区域直接影响着图像聚焦状态的判断,而有些像素则与图像是否聚焦关系不大,如果能将这种差异找出来并以一定的特征进行描述,那么在聚焦函数计算过程中就可以增强那些对聚焦状态影响较大的像素或区域的计算权重而抑制那些对聚焦状态影响很少的像素或区域的计算权重,从而从根本上提高聚焦函数的陡峭度和聚焦的成功率.

2 基于图像内容重要度加权的聚焦函数增强

2.1 内容像素及其重要度因子

基于图像处理的自动聚焦过程,实际上就是在一系列图像中寻找清晰度最大的图像所对应的图像获取位置的过程.这一系列图像是沿着光轴(或 z 轴)每隔一定的间隔(或步长)对同一个场景(或视野)所获取的图像,这意味着不同离焦程度的图像中具有相同坐标的像素点(称为对应像素点)或对应区域之间存在某种关联,当显微镜沿着光轴移动时,这些对应像素点应该表现出一定的变化规律.图 2(a)~图 2(d)分别给出了同一视野下离焦深度不同的图像,其中,图 2(a)为深度离焦图像,该图像除了部分“杂质”外,几乎看不到任何“内容”,图像显得非常“平坦”.这种杂质是由微观尘埃附着在镜头和相机 CCD 传感器上造成的,在很多情况下,由于图像采集环境的原因,“杂质”不可避免.图 2(b)为轻度离焦图像,图像中“杂质”依然存在,而与深度离焦图像不同的是,图像中出现了我们感兴趣的内容,只不过这些内容显得比较模糊.在图 2(c)中,图像内容则非常清晰,与深度离焦图像及轻度离焦图像一样,图像中“杂质”依然存在.显然,在图像经历从离焦到聚焦的过程中,产生变化的只有内容像素,而“杂质”及其他像素几乎没有发生变化.基于此分析,我们可以将图像中的像素分为 3 类:内容像素、杂质像素和背景

像素.显然,对图像聚焦状态判断起作用的是内容像素,而杂质像素和背景像素对图像聚焦状态的判断意义不大,因此,我们将这两类像素统称为无效像素.那么,如何将内容像素从其他两类像素中区分出来呢?图 2(e)给出了这 3 类像素的梯度幅值变化曲线,显然,在图像经历从离焦到聚焦再到离焦的整个过程中,内容像素的梯度幅值首先单调增加,然后单调减少;而杂质像素的梯度幅值则一直维持在一个较高的水平上;背景像素的梯度幅值则在较低的水平波动.也即在聚焦过程中,只有内容像素的梯度幅值产生较大变化,而其他两类像素的梯度幅值则基本不变.因此,可以用像素沿着 z 轴的梯度幅值变化量,将内容像素从其他两类像素中区分出来.

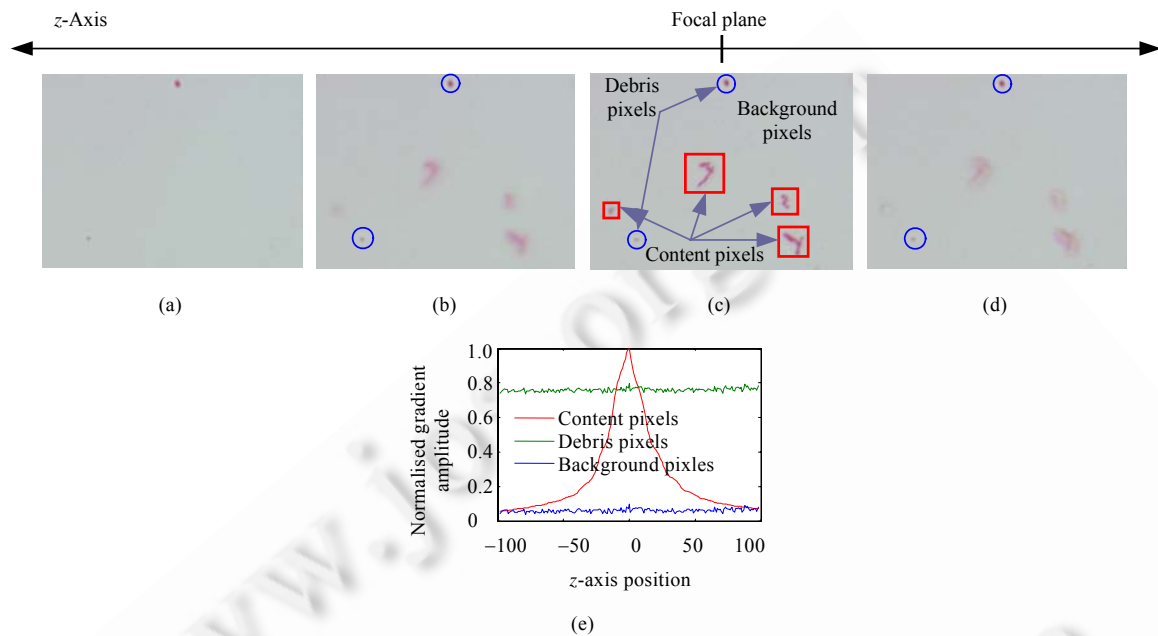


Fig.2 Images captured at different z -axis positions under the same viewpoint from a sputum sample and normalized gradient magnitude curves of different pixels types

图 2 不同 z 轴位置获取的同一视野图像及不同类型像素的归一化梯度幅值变化曲线

设 I_c 和 I_r 分别为同一视野下离焦程度不同的两幅图像(如图 3 所示),为了区分,我们将 I_c 称为当前图像,将 I_r 称为参考图像.考虑当前图像 I_c 中任意像素点 (x,y) ,定义该像素点的 z 轴梯度变化率如下:

$$r(x,y) = \frac{|G_c(x,y) - G_r(x',y')|}{\min\{G_c(x,y), G_r(x',y')\}} \quad (7)$$

其中, $G_c(x,y)$ 和 $G_r(x',y')$ 分别为 I_c 和 I_r 在像素点 (x,y) 及对应像素点 (x',y') 处的梯度幅值.理想情况下,像素点 (x,y) 及对应像素点 (x',y') 在图像平面具有相同的坐标值,也即 $x'=x, y'=y$.在实际应用中,如果显微镜 z 轴机械传动机构的垂直度不佳,那么在聚焦过程中显微镜载物台会在水平方向发生轻微移动,从而导致图像中对应像素的位置发生轻微改变,此时, (x,y) 和 (x',y') 满足如下关系:

$$\begin{cases} x' = x + \Delta x \cdot \Delta z \\ y' = y + \Delta y \cdot \Delta z \end{cases} \quad (8)$$

其中, $\Delta x, \Delta y$ 为显微镜 z 轴移动单位步长时,像素点 (x,y) 及对应像素点 (x',y') 之间的偏移量; $\Delta z = |z - z'|$ 为显微镜沿着 z 轴移动的距离.偏移量 $\Delta x, \Delta y$ 可以在显微镜标定的过程中通过实验的方式测定出来,如果偏移不是太大(一般设计较好的显微镜均满足此要求),可以近似认为 $x'=x, y'=y$.这种近似对 z 轴梯度变化率的影响不会太大,因为在图像的一个较小邻域内,不同像素的灰度值具有很大的相似性,一般不会发生剧烈的变化.

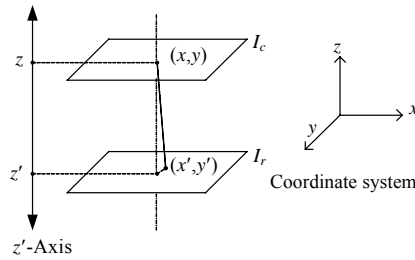


Fig.3 Sketch map of two images captured at different z -axis positions from the same viewpoint and the offset of a given pixel

图3 显微镜对同一个视野在不同的 z 轴位置采集的图像及像素偏移示意图

根据以上 z 轴梯度变化率定义可知,对于杂质像素及平坦像素,由于 $G_c(x,y)$ 和 $G_r(x',y')$ 的差值非常小,因此这类像素的 z 轴梯度变化率非常小;对于内容像素, $G_c(x,y)$ 和 $G_r(x',y')$ 的差值则非常大,因此这类像素的 z 轴梯度变化率一般较大.因此,我们可将像素的 z 轴梯度变化率作为判决内容像素的条件.设 Ω_c 为当前图像 I_c 中所有内容像素所构成的集合,若 (x,y) 为内容像素,也即 $(x,y) \in \Omega_c \subset I_c$, 当且仅当该像素点的 z 轴梯度变化率大于判决阈值 T , 也即

$$r(x,y) > T \quad (9)$$

注意到梯度计算对噪声非常敏感,因此我们对梯度的计算在传统计算方式基础上进行了改进:首先对图像采用标准差为 σ 的高斯核 G_σ 进行卷积运算(\otimes),以去除大部分随机噪声;然后采用梯度算子 ∇ (比如简单差分或 sobel 算子)求其梯度,获取梯度图像后,对该梯度图像再次采用高斯核 G_σ 进行平滑.因此,上式中梯度 $G_c(x,y)$ 可如下计算:

$$G_c(x,y) = \nabla(I_c(x,y) \otimes G_\sigma) \otimes G_\sigma \quad (10)$$

考虑到卷积运算是线性移不变的,因此很容易推出上式可写为

$$G_c(x,y) = (\nabla G_\sigma \otimes G_\sigma) \otimes I_c(x,y) \quad (11)$$

上式表明,对图像首先进行高斯平滑并求其梯度,然后对梯度图像进行高斯平滑,等同于用新的卷积核 $K = \nabla G_\sigma \otimes G_\sigma$ 对原始图像进行单次卷积运算,即

$$G_c(x,y) = K \otimes I_c(x,y) \quad (12)$$

对于图像聚焦状态的判断,不同的像素其相对重要程度是不同的.杂质像素和背景像素几乎没有贡献,而不同的内容像素,其贡献也并不相等.内容像素的 z 轴梯度变化率越大,其对图像聚焦状态判断的贡献越大.这里,我们利用归一化的 z 轴梯度变化率来表征不同像素对图像聚焦状态判断的相对重要程度,并称其为图像的内容重要度因子.对于给定像素点 (x,y) ,若其 z 轴梯度变化率为 $r(x,y)$,则其重要度因子 $\alpha(x,y)$ 定义为

$$\alpha(x,y) = \frac{r(x,y)}{\sum_x \sum_y r(x,y)} \quad (13)$$

显然,所有像素重要度因子之和为 1,也即

$$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} \alpha(x,y) = 1 \quad (14)$$

图 4(c)给出了利用图 4(a)和图 4(b)计算获取的图像内容重要度因子三维曲面图.从图中可以看出,重要度因子与图 4(a)和图 4(b)中像素的性质和分布位置密切相关,杂质像素和背景像素的重要度因子几乎全部为 0,而内容像素的重要度因子则非常大,而且不同的内容像素,其重要度因子的值是不同的,表明不同的内容像素对图像聚焦状态判断的贡献是不同的.

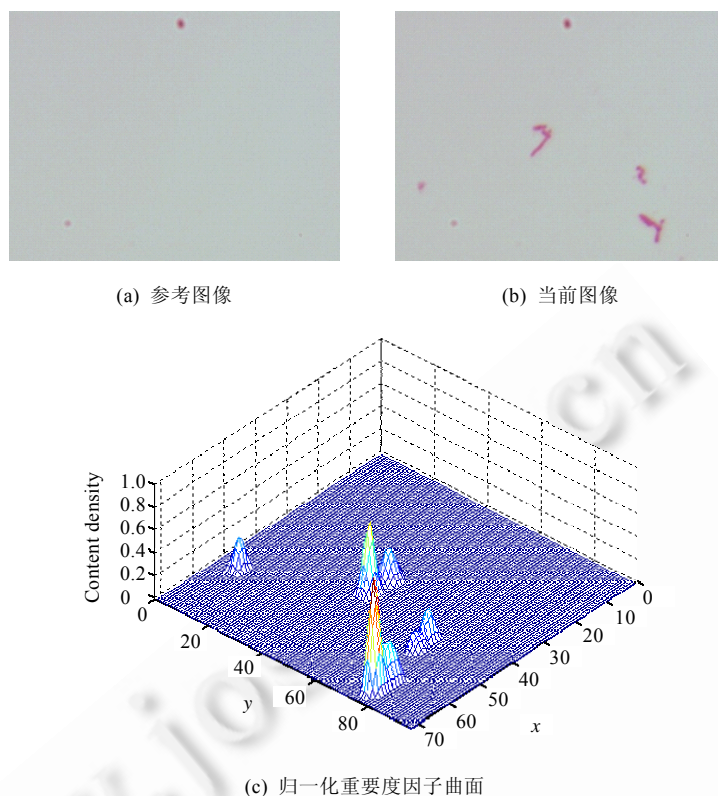


Fig.4 Normalized content importance factor curve for current image according to the reference image
图4 依据参考图像获取的当前图像的归一化内容重要度因子三维曲面图

下面给出基于内容重要度加权的聚焦函数 F_c .

$$F_c = \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} \alpha(x, y) f(x, y) \tag{15}$$

其中 $f(x, y)$ 为 (x, y) 点处的聚焦测度, 可采用任何一种梯度类函数进行计算, 比如公式(2)~公式(6)给出的函数. 比较公式(1)和公式(15)可以发现, 传统聚焦函数计算方式将每个像素赋予同等的权重, 而基于内容重要度加权的聚焦函数则给每个像素赋予不同的权重. 显然, 当每个像素的重要度因子都相同时, 即 $\alpha(x, y) = \frac{1}{WH}$ 时, 基于内容重要度加权的聚焦函数退化为传统聚焦函数. 因此, 可以认为传统聚焦函数是基于内容重要度加权的聚焦函数的一种特例.

2.2 图像子块重要度因子及聚焦函数增强

以上对图像内容重要度的分析是逐个像素进行的, 实际上, 我们还可以对组成图像的每个区域或每个子块采用同样的方式进行分析. 这样做有两个优点: 一个是可以降低计算的复杂度, 注意到 z 轴梯度变化率和像素重要度的计算都需要进行除法运算, 当图像比较大时, 整个计算比较耗时; 另一个是当显微镜 z 轴转动机构垂直度不佳导致对应像素发生偏移时, 当前图像与参考图像之间的对应图像块能够最大程度地保持对应关系, 这就降低了对机械系统的要求.

对于大小为 $W \times H$ 的图像, 首先将其划分 $P \times Q$ 个子块, 每个子块的大小为 $w \times h$, 其中, $w = \frac{W}{Q}, h = \frac{H}{P}$. 为了保证子块大小为整数, 一般要求 W, H 各自能被 Q, P 整除. 对于子块 $B(p, q)$, 定义其 z 轴梯度变化率 $r(p, q)$ 如下:

$$r(p,q) = \frac{|\bar{G}_c(p,q) - \bar{G}_r(p,q)|}{\min\{\bar{G}_c(p,q), \bar{G}_r(p,q)\}} \quad (16)$$

其中, $\bar{G}_c(p,q)$ 和 $\bar{G}_r(p,q)$ 分别为当前图像 I_c 的子块 (p,q) 和参考图像 I_r 的对应子块 (p,q) 内像素梯度幅值的均值, 即

$$\bar{G}_i(p,q) = \frac{1}{wh} \sum_{(x,y) \in B(p,q)} G_i(x,y), \quad i \in \{c,r\} \quad (17)$$

子块内每个像素的梯度 $G_i(x,y)$ 利用公式(12)进行计算. 子块 $B(p,q)$ 的重要度因子定义为

$$\alpha(p,q) = \frac{r(p,q)}{\sum_p \sum_q r(p,q)} \quad (18)$$

这些重要度因子实际上构成了重要度矩阵 A ,

$$A = [\alpha(p,q)]_{P \times Q} = \frac{1}{\sum_p \sum_q r(p,q)} \cdot \begin{pmatrix} r(0,0) & \dots & r(0,Q-1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ r(P-1,0) & \dots & r(P-1,Q-1) \end{pmatrix} \quad (19)$$

这样, 对于每个图像子块, 都有唯一一个重要度因子相对应. 与公式(15)相类似, 基于重要度加权的聚焦函数可写成

$$F_c = \sum_{p=0}^{P-1} \sum_{q=0}^{Q-1} \alpha(p,q) \bar{f}(p,q) \quad (20)$$

其中, $\bar{f}(p,q)$ 为子块 $B(p,q)$ 中所有像素的聚焦测度值的平均值:

$$\bar{f}(p,q) = \frac{1}{wh} \sum_{(x,y) \in B(p,q)} f(x,y) \quad (21)$$

2.3 参考图像的选取

由公式(16)和公式(18)可知, 参考图像的选取对 z 轴梯度变化率和重要度因子的计算有很大影响, 对同一副当前图像, 选取不同的参考图像, 其像素或子块的 z 轴梯度变化率和重要度因子都会不同. 根据实际的聚焦过程, 我们给出两种参考图像的选取方式:

(1) 固定选取模式. 在这种模式下, 所有待分析图像的参考图像是相同的, 均为提前选好的同一幅图像, 一般选取深度离焦图像作为参考图像. 当采用这种模式时, 随着显微镜从远离焦平面的位置向焦平面靠近, 内容像素或区域的重要度会急剧增加, 从而使得聚焦函数的陡峭度急剧增加, 这极大地方便了函数极大值的搜索. 这种模式唯一的缺点就是在聚焦前必须获取深度离焦图像作为参考图像, 但考虑到实际应用中只要显微镜参数、相机参数及光照参数没有变化, 不同的视野其深度离焦图像差异就非常小, 尤其是杂质像素的位置是一致的, 背景像素占据了图像绝大部分面积, 图像中没有任何内容像素, 因此在显微镜标定过程中即可获取参考图像. 当开始自动聚焦时, 对任何当前图像其参考图像, 是已知的. 这就避免了对每一个视野获取参考图像的麻烦. 这在多视野自动扫描显微镜的聚焦中是非常有效的.

(2) 动态选取模式. 在这种模式下, 不同的当前图像, 其参考图像是不一样的, 参考图像随着聚焦过程的进行而不断地更新, 设 $I_i (i=0,1,2,\dots)$ 为显微镜自动聚焦过程中按照一定的搜索策略采集的一系列图像, 那么对当前图像 I_n 来说, 可以选取其前一幅图像 I_{n-1} 作为其参考图像. 因此在这种模式下, 参考图像的概念是相对的, 同一幅图像, 对于其前一幅图像来说是当前图像, 而对于其下一幅图像来说则是参考图像. 这种模式的优点是无须提前获取参考图像, 参考图像的选取非常灵活; 缺点是图像中内容像素或区域的重要度因子相对于固定选取模式而言比较小, 算法对聚焦曲线陡峭度的增强能力不如固定选取模式. 因此在实际应用中, 我们推荐采用固定选取模式选取参考图像.

3 算法性能评估

3.1 图像数据获取

采用 Olympus 显微镜光路系统及大恒 CCD 相机采集图像,其中,物镜放大率为 100 倍(油镜),其数值孔径为 1.25;CCD 相机分辨率为 1392×1040 (141M);传感器芯片尺寸为 $8.8\text{mm} \times 6.6\text{mm}$ (规格为 2/3inch);整个显微镜系统景深约为 $0.5\mu\text{m}$.载物台为我们自行研发的三轴运动平台.该平台在电机的驱动下可沿 X,Y,Z 三轴运动,其中, Z 轴传动系统采用高精度步进电机及滚珠丝杠,步进分辨率为 $0.02\mu\text{m}$.以显微镜焦平面为原点采集 1 幅图像,然后在焦平面左右两侧各采集 98 幅图像,相邻图像间的步长为 $0.4\mu\text{m}$,小于显微镜景深,这样可以获得非常精细的分析结果.其中,标本为肺结核病人的痰涂片样本,为了更具一般性,我们在大量标本中选取了 3 组非常典型的样本,样本按照所观察图像中内容的多寡分别以 A,B,C 标记,其中, A 样本图像内容非常丰富, B 样本具有一定的图像内容,而 C 样本图像内容非常稀疏.这样,我们获取了 3 组图像数据,每组有 197 幅图像.为了便于计算,我们将所有图像的大小统一为 800×600 .图 5 中第 1 行为 A 组样本中几幅典型的图像,第 2 行和第 3 行分别为 B 组样本和 C 组样本中的几幅典型图像.

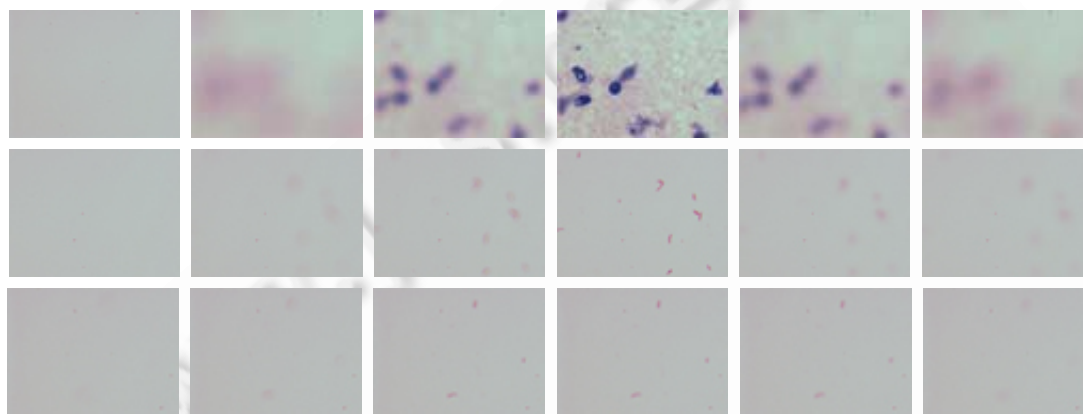


Fig.5 Sample images

图 5 样本图像

3.2 性能评估

选取深度离焦图像作为参考图像,采用公式(20)分别计算 A,B,C 这 3 组样本中每个采样点(也即每幅图像)的聚焦函数值,其中,图像块的长宽均取 10 像素(即 $w=h=10$),这样,每幅图像子块的数量为 80×60 个(即 $Q=80, P=60$),结果如图 6 所示.图中深色较粗的曲线代表采用传统非加权算法获取的聚焦曲线,浅色较细的曲线代表采用本文算法对聚焦函数进行增强后获取的聚焦曲线.在这两种计算方式下,单个像素点聚焦测度 f 均采用 Tenengrad 函数(公式(3)).分析图中曲线可知,对于内容比较丰富的图像(样本 A),传统非加权聚焦函数的最大值比较显著(图 6(a)中深色较粗的曲线),采用本文算法对聚焦函数增强后,聚焦曲线的陡峭度进一步增大,在最大值附近,曲线非常陡峭,这非常有利于曲线最大值的搜索;对于内容比较稀疏的图像(样本 B)和内容极少的图像(样本 C),传统非加权聚焦函数的最大值是不显著的(图 6(b)和图 6(c)中深色较粗的曲线),尤其是图 6(c)中传统非加权聚焦曲线一直在较低的水平上波动,函数的最大值淹没在噪声中而无法辨识,这种情况下是不可能找到焦平面的.注意到这里采用了性能非常优异的 Tenengrad 函数进行计算得出这种结果,如果采用其他传统非加权聚焦函数则性能更差.当采用本文算法对聚焦函数增强后,聚焦曲线的陡峭度急剧增加(图 6(b)、图 6(c)中浅色较细的曲线),函数的最大值也非常显著,这将极大提高自动聚焦的成功率.因此,本文的算法无论对内容丰富的图像还是对内容稀疏的图像都有效.考虑到当聚焦曲线陡峭度增大到一定程度后如果继续增加,对自动聚焦性能的提高影响不大,因此,本文的算法尤其适合于图像内容比较稀疏情况下的自动聚焦.而当图像内容比较丰富

时,可以考虑采用传统非加权聚焦函数.另外,这里我们仅以 Tenengrad 函数为例进行了增强,实际上,该算法还可以对其他任何基于梯度的聚焦函数进行增强,比如公式(2)~公式(6)给出的几个典型聚焦函数.

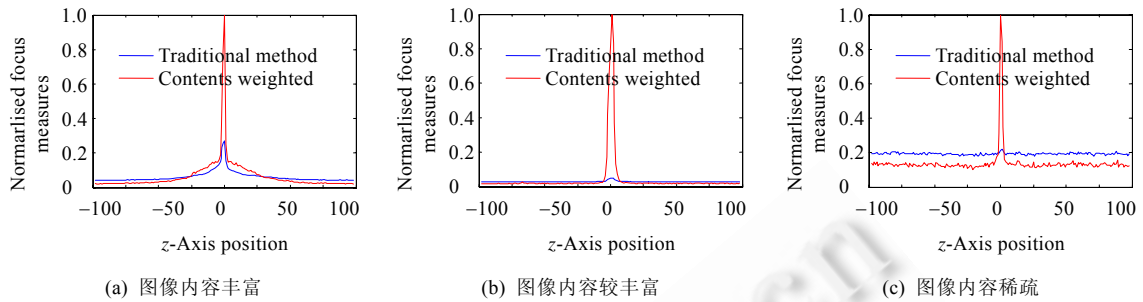


Fig.6 Comparison of the performance of our content weighted focus curves and the traditional unweighted focus curves

图 6 本文的加权聚焦函数曲线与传统非加权聚焦函数曲线的性能比较

以上仅给出了当图像块大小为 10 个像素时聚焦曲线的性能,实际上,当采用分块方式对聚焦函数进行增强时,图像块的大小对算法性能有很大影响.当图像块长、宽均取 1 个像素时,分块方式等同于逐像素分析方式.因此,我们将这两种方式一起进行分析.图 7 给出了当图像块的大小变化时,聚焦曲线的变化情况.显然,当图像块长、宽均为 1 时,增强后的聚焦曲线有最大的陡峭度,随着图像块大小的增加,聚焦曲线的陡峭度随之减小;但无论图像块有多大(除非其大小与图像大小一致),增强后的聚焦曲线的陡峭度始终大于传统非加权聚焦曲线的陡峭度.当图像块大小等于图像大小时,由于整个图像只有 1 个子块,此时,本文算法退化为传统非加权聚焦函数算法,这两种算法的聚焦曲线将具有相同的形态.

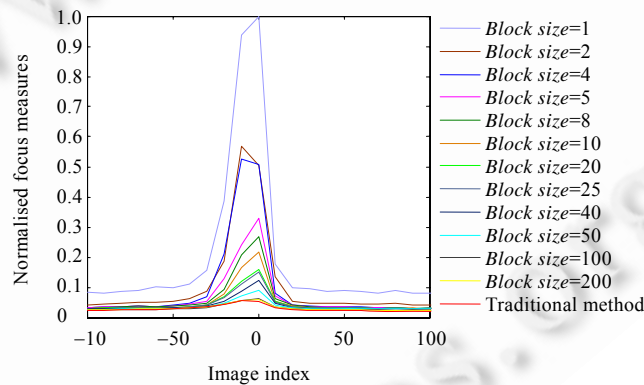


Fig.7 Influence of image block size on the performance of the proposed method

图 7 图像子块大小对本文算法性能的影响

3.3 算法复杂度分析及图像块尺寸参数的选取

由公式(16)和公式(18)可知,重要度因子的计算需要大量的除法运算,因此这部分计算比较耗时;另外,无论对图像是否分块,也无论分块的大小是多少,均需计算整幅图像中每个像素点的聚焦测度值,这部分计算也比较耗时.除了这两部分以外,还有一些额外的计算开销 T_e ,比如求绝对值、求平均值等,但这部分计算时间相对于前两部分而言小得多.因此,算法总耗时为

$$T=T_f+T_{if}+T_e \quad (22)$$

其中, T_f 代表图像中每个像素点聚焦测度计算时间的总和,这部分时间主要由整幅图像的大小及采取何种聚焦

函数 f 决定,当图像大小及聚焦函数 f 确定时,其计算时间确定,这部分时间也可以看成是传统聚焦算法总的计算时间; T_{if} 代表图像子块重要度因子的计算时间的总和,这部分计算时间主要由图像子块的数量决定,忽略一些额外的时间消耗,可以认为 T_{if} 与图像子块的数量成正比,即

$$T_{if} \propto P \times Q \tag{23}$$

将 $P = \frac{N}{h}, Q = \frac{M}{w}$ 带入上式,取 $w=h$,若图像大小一定,则可得:

$$T_{if} \propto \frac{1}{w^2} \tag{24}$$

也即 T_{if} 与图像块的长宽成平方反比关系.因此,算法总耗时 T 可进一步写成

$$T = (T_f + T_e) + k \cdot \frac{1}{w^2} \tag{25}$$

其中, k 为一个常数.显然,当 $k \cdot \frac{1}{w^2} \gg (T_f + T_e)$ 时,也即当图像子块尺寸很小时,算法总耗时 T 主要取决于图像子块重要度计算时间 T_{if} ,且对图像子块的大小非常敏感;当 $k \cdot \frac{1}{w^2} \ll (T_f + T_e)$ 时,也即当图像子块尺寸较大时,算法总耗时 T 主要取决于图像大小及聚焦函数 f 的选择,此时,图像子块尺寸的增加并不会导致总计算时间 T 的显著减少.由上一节的分析可知,图像子块尺寸的增加意味着聚焦曲线陡峭度的降低.因此,在保证计算时间不显著增加的情况下,要尽可能选取较小的图像块尺寸,以确保算法性能.

我们在 PC 机上对算法耗时进行测试,仍然采用样本 A,B,C,单像素点聚焦测度采用 Tenengrad 函数进行计算.测试条件如下:CPU: Intel Core(TM)2 E7400@2.80GHz,内存:2G;算法采用 VC6.0 编程实现.结果见表 1(图 8 给出了算法耗时随图像子块大小的变化曲线),表中第 1 行为图像块大小,时间单位为 ms.从测试结果来看,当图像块尺寸非常小时,算法非常耗时,比如,长、宽均取 1 时,每个样本中每幅图像的耗时均在 3 000ms 以上;随着图像块尺寸的增大,算法耗时急剧减少,当图像块长宽均为 10 时,所有样本中每幅图像的耗时均小于 100ms;当图像块尺寸继续增加时,算法耗时将基本维持不变.为了便于比较,表中最后一列给出了采用传统非加权算法时所消耗的时间.显然,随着图像块尺寸的增大,本文算法的耗时将逐渐接近传统非加权算法的耗时.尤其注意到,当图像块大小取 10 时,每幅图像 100ms 的计算时间也完全满足自动聚焦实时性的要求.

Table 1 Time consumed of the proposed method (under different block sizes)

表 1 本文算法的耗时情况(不同子块尺寸)

	1	2	4	5	8	10	20	25	40	50	100	200	Traditional method
A	3 281	961	260	209	119	96	86	83	80	79	76	74	67
B	3 309	950	269	210	116	97	84	81	80	77	75	74	69
C	3 308	976	271	212	115	99	89	82	81	79	78	76	70

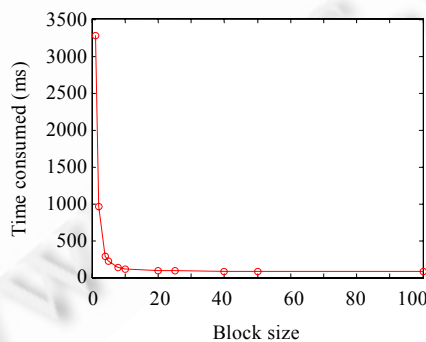


Fig.8 Time consumed by the proposed method under different block sizes

图 8 本文算法耗时随子块尺寸的变化曲线

3.4 自动聚焦实验

将本文算法应用于我们自行研发的全自动显微镜中.需要指出的是,显微镜自动聚焦除了聚焦函数以外,还必须考虑极大值搜索策略,聚焦函数决定了聚焦的可靠性和精度,而搜索策略则决定了聚焦的速度;同时,搜索策略还要考虑防止搜索陷入局部极值.目前提出的搜索策略非常多,典型的有盲人爬山搜索算法^[20,21]、曲线拟合搜索算法^[3]、Fibonacci 搜索算法^[15]等.其中,曲线拟合法和 Fibonacci 法均对聚焦曲线的形态有一定的要求,虽然在一定情况下可以提高搜索速度,但是当噪声影响比较大使得聚焦曲线形态发生一定变化时,这些算法变得非常不稳定;盲人爬山搜索虽然速度较慢,但其性能非常稳定.由于搜索策略不是本文研究重点,这里我们仅以常用的盲人爬山搜索策略为例,来测试本文基于图像内容重要度加权的聚焦算法在实际自动聚焦系统中的性能.盲人爬山搜索基本原理如图 9 所示,首先设定一个初始位置 P_0 并计算该位置的聚焦评价函数值 $F(P_0)$,然后任意选择一个方向(比如选择向右)让电机驱动调焦机构沿着 Z 轴运动一定的步长 S 到达位置 P_1 并计算该位置的聚焦评价函数值 $F(P_1)$,比较 $F(P_0)$ 与 $F(P_1)$ 的大小,若 $F(P_0) < F(P_1)$,则保持方向不变继续搜索,直至 $F(P_{n-1}) > F(P_n)$;接下来进行反向搜索,搜索过程与正向搜索过程一样,不过步长要小于正向搜索步长,一般取正向步长的一半或更小;如此反复,直至在满足一定精度要求的情况下搜索到最大值,此位置即为最佳聚焦位置.在实际搜索过程中,由于受噪声影响导致聚焦曲线出现很多局部极值,为了防止陷入局部极值,我们定义如下判决因子:

$$T = \frac{F(P_{n-1}) - F(P_n)}{F(P_{n-1})} \quad (26)$$

并给出判决准则:(1) 若 $T \leq Th$,则认为局部极值点,需要继续朝原方向搜索;(2) 若 $T > Th$,则认为已经“越顶”,需要返回搜索.其中, Th 为判决阈值,与聚焦函数、图像内容、噪声等因素相关,经过实验,确定 $Th=0.05$ 比较合理.

具体实验配置为:显微镜及相机参数与第 3.1 节一致,图像子块的长宽均取 10 个像素,单像素聚焦测度采用 Tenengrad 函数.从大量肺结核病人的痰涂片样本中选取 3 个典型玻片样本.由于进行了一定的物理化学处理,这 3 个玻片中图像内容丰富程度有很大区别,我们分别以 H(high content),M(median content),L(low content)标识.利用全自动显微镜系统(如图 10(a)所示)对玻片沿着一定的路径(如图 10(b)所示)进行扫描,每个玻片扫描

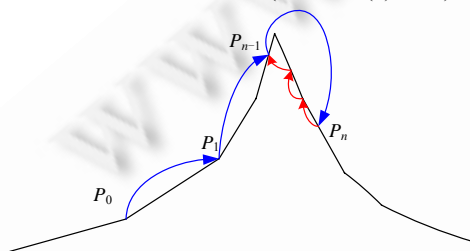
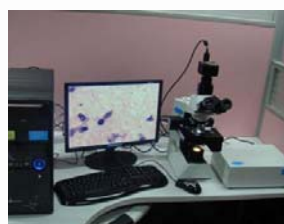


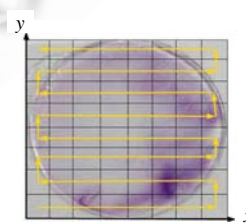
Fig.9 Blind climbs hill search algorithm

图 9 盲人爬山搜索算法

300 个视野.由于显微镜系统景深非常小(约 $0.5\mu\text{m}$),显微镜载物台沿着 X 方向或 Y 方向每移动一个视野,对应视野中的图像将发生离焦模糊,这时需要进行自动聚焦.我们分别利用传统非加权聚焦算法和本文基于内容重要度加权的聚焦算法进行聚焦测试(搜索策略均采用上述盲人爬山法),聚焦效果采用聚焦成功率来表示,定义为成功聚焦的视野数量除以所有扫描的视野数量,结果见表 2.从表中数据可知,当玻片中图像内容非常丰富时,无论是传统非加权聚焦算法还是本文的算法,其聚焦成功率都非常高,随着玻片中图像内容的减少,传统非加权聚焦算法的成功率明显降低.尤其在内容非常稀疏的情况下,传统聚焦算法的成功率仅为 24%(意味着 300 个视野中,仅仅有 72 个视野聚焦成功).相比之下,本文算法的聚焦成功率高达 90%,远高于传统算法的成功率.



(a) 自行研发的全自动显微镜系统



(b) 扫描路径

Fig.10 Our automatic microscopy system and the scanning path

图 10 我们自行研发的全自动显微镜系统及其扫描路径

Table 2 Comparison of autofocusing success rate using the proposed method and the traditional method respectively**表 2** 本文算法与传统算法自动聚焦成功率的比较

	H	M	L
The proposed method (%)	98	93	90
Traditional method (%)	95	86	24

4 结 论

基于聚焦函数的显微镜自动聚焦算法,其性能与图像内容密度密切相关,当图像内容密度非常低时(稀疏内容),传统聚焦算法往往无法成功地找到焦平面.虽然有学者注意到了这个问题,但是没给出有效的解决方案.本文通过分析显微镜自动聚焦过程中不同离焦深度图像中的对应像素的梯度变化规律,提出一种基于图像内容重要度加权的聚焦函数增强算法.该算法利用聚焦过程中当前图像与参考图像中对应像素沿光轴方向的梯度变化规律对像素进行分类,并根据不同像素对图像清晰程度判决的贡献大小自适应地调整当前像素的重要度因子.通过这种方式增强了图像内容像素的计算权重,并有效抑制了镜头杂质及背景噪声,极大地增强了聚焦曲线的陡峭度.在此基础上,采用基于图像分块的方式来降低算法复杂度,并进一步消除显微镜 Z 轴机械系统误差对算法性能的影响.最后,基于我们自行研发的全自动显微镜对本文算法进行了实验,结果表明,在图像内容非常稀疏的情况下,本算法的聚焦成功率高达 90%,而传统聚焦算法的成功率仅为 24%.这表明,本文的算法能够大幅度地提高自动聚焦的成功率,可应用于实际显微镜自动聚焦系统中.

References:

- [1] Zhai YP, Zhou DX, Liu YH, Liu S, Peng KJ. Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection. ACTA OPTICA SINICA, 2011,31(4):0418002 (in Chinese with English abstract).
- [2] Zhai YP, Zhou DX, Liu S, Liu YH, Fung WK. Content based focus measure for robust auto-focusing of microscopy in biomedical applications. In: Proc. of the IEEE 4th Int'l Conf. on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NANOMED). Hong Kong, 2010. 130–135. [doi: 10.1109/NANOMED.2010.5749819]
- [3] Nayar SK, Nakagawa Y. Shape from focus. IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1994,16(8):824–831. [doi: 10.1109/34.308479]
- [4] Tenenbaum JM. Accommodation in computer vision [Ph.D. Thesis]. Stanford: Stanford University, 1970.
- [5] Brenner JF, Dew BS, Horton JB, King T, Neurath PW, Selles WD. An automated microscope for cytological research a preliminary evaluation. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1976,24(1):100–111. [doi: 10.1177/24.1.1254907]
- [6] Ge Y, Nelson BJ. Wavelet-Based autofocusing and unsupervised segmentation of microscopic images. In: Proc. of the IEEE/RSJ Int'l Conf. on Intelligent Robots and Systems. 2003. 2143–2148. [doi: 10.1109/IROS.2003.1249188]
- [7] Makkapati VV. Improved wavelet-based microscope autofocusing for blood smears by using segmentation. In: Proc. of the 5th Annual IEEE Conf. on Automation Science and Engineering. Bangalore, 2009. [doi: 10.1109/COASE.2009.5234192]
- [8] Guo BH, Liao QL, Yu Z. An algorithm of fast auto-focusing based on wavelet transform. ACTA SCIENTIARUM NATURALIUM UNIVERSITATIS SUNYATSENI, 2007,46(2):12–15 (in Chinese with English abstract).
- [9] Subbarao M, Tyan JK. Selecting the optimal focus measure for autofocusing and depth-from-focus. IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1998,20(8):864–870. [doi: 10.1109/34.709612]
- [10] Santos A, Solórzano CO, Vaquero JJ, Peña JM, Malpica N, Del Pozo F. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis. Journal of Microscopy, 1997,188(3):264–272. [doi: 10.1046/j.1365-2818.1997.2630819.x]
- [11] Sun Y, Duthaler S, Nelson BJ. Autofocusing algorithm selection in computer microscopy. In: Proc. of the Intelligent Robots and Systems (IROS 2005). 2005. [doi: 10.1109/IROS.2005.1545017]
- [12] Russell MJ, Douglas TS. Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy. In: Proc. of the 29th Annual Int'l Conf. of the IEEE EMBS Cité Internationale. Lyon, 2007. [doi: 10.1109/IEMBS.2007.4353082]

- [13] Sun J, Yuan YH, Wang CY. Comparison and analysis of algorithms for digital image processing in autofocusing criterion. ACTA OPTICA SINICA, 2007,27(1):35-39 (in Chinese with English abstract).
- [14] Lüthi BS, Thomas N, Hwiid SF, Rueffer P. An efficient autofocus algorithm for a visible microscope on a Mars lander. Planetary and Space Science, 2010,58(10):1258-1264.
- [15] Chen GJ. Implementing the auto-focusing system based on the digital image process technology [Ph.D. Thesis]. Xi'an Electronics University, 2007 (in Chinese with English abstract).
- [16] Li Q, Feng HJ, Xu ZH. Autofocus system experiment study using variational image-sampling. ACTA PHOTONICA SINICA, 2003, 32(12):1499-1501 (in Chinese with English abstract).
- [17] Zhu KF, Jiang W, Gao Z, Zhou X, Zhang J. Focusing window choice and parameters determination in automatic focusing system. ACTA OPTICA SINICA, 2006,26(6):836-840 (in Chinese with English abstract).
- [18] Zhang L, Jiang W, Gao Z. Automatic focusing region selection algorithm based on first order of digital image. Optical Technique, 2008,34(2):163-169 (in Chinese with English abstract).
- [19] Tang ZM, Zhang L, Xie P. Implementation of an automatic focusing algorithm based on spatial high frequency energy and entropy. ACTA ELECTRONICA SINICA, 2003,31(4):552-555 (in Chinese with English abstract).
- [20] Choi KS, Lee JS, Ko SJ. New autofocusing technique using the frequency selective weighted median filter for video cameras. IEEE Trans. on Consumer Electronics, 1999,45(3):820-827. [doi: 10.1109/30.793616]
- [21] He J, Zhou RZ, Hong ZL. Modified fast climbing search auto-focus algorithm with adaptive step size searching technique for digital camera. IEEE Trans. on Consumer Electronics, 2003,49(2):257-262. [doi: 10.1109/TCE.2003.1209511]

附中文参考文献:

- [1] 翟永平,周东翔,刘云辉,刘顺,彭科举.聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取.光学学报,2011,31(4):0418002.
- [8] 郭丙华,廖启亮,余志.基于小波变换的快速自动聚焦算法.中山大学学报(自然科学版),2007,46(2):12-15.
- [13] 孙杰,袁跃辉,王传永.数字图像处理自动图像聚焦算法的分析和比较.光学学报,2007,27(1):35-39.
- [15] 陈国金.数字图像自动聚焦技术研究及系统实现[博士学位论文].西安:西安电子科技大学,2007.
- [16] 李奇,冯华君,徐之海.自动对焦系统中图像非均匀采样的实验研究.光子学报,2003,32(12):1499-1501.
- [17] 朱孔凤,姜威,高赞,周贤,张进.自动聚焦系统中聚焦窗口的选择及参量的确定.光学学报,2006,26(6):836-840.
- [18] 张乐,姜威,高赞.数字图像一阶矩的自动聚焦区域选择算法.光学技术,2008,34(2):163-169.
- [19] 唐宗明,张利,谢攀.一种基于能量和熵的自动聚焦算法.电子学报,2003,31(4):552-555.



翟永平(1982-),男,甘肃陇南人,博士生, CCF 学生会员,主要研究领域为医学图像处理,计算机视觉.



周东翔(1968-),男,博士,副教授,主要研究领域为计算机视觉,图像处理.



刘云辉(1965-),男,博士,教授,博士生导师,主要研究领域为机器人学,机电系统,计算机视觉.



刘顺(1970-),男,博士,主要研究领域为机器人学,机电系统.