

数字切片扫描仪的实时跟踪焦面方法

陈木旺*

麦克奥迪实业集团有限公司, 福建 厦门 361006

摘要 数字切片扫描仪的扫描速度和图像质量是用户最为关注的两个指标。为了同时提高扫描速度和图像质量,设计了一种基于倾斜摄像头的实时对焦装置。该装置只需拍摄一张图像即可计算出离焦量,计算时间仅为 12.1 ms,并在此基础上实现与扫描摄像头的同步工作,可以在连续扫描过程中实时跟踪焦面,即边扫描边对焦。与传统的先建模后扫描的方法相比,边扫描边对焦方法不仅省去了建模时间,同时提高了扫描质量。

关键词 显微镜; 数字切片扫描仪; 自动对焦; 倾斜摄像头

中图分类号 TH742 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1611009

Real-Time Tracking Focal Plane Method of Digital Slide Scanner

Chen Muwang*

MOTIC CHINA GROUP Co., Ltd., Xiamen 361006, Fujian, China

Abstract The scanning speed and image quality of the digital slide scanner are the two features that users are most concerned about. A real-time focusing configuration centered on a tilted camera is meant to enhance the scanning speed and image quality simultaneously. The device can calculate the defocus distance by taking only one image, and the computation time is only 12.1 ms. Furthermore, based on this, the focal plane can be tracked in real time during the continuous scanning by manipulating the tilted camera and the scanning camera synchronously, which is synchronous focusing and scanning. Synchronous focusing and scanning method saves modeling time and improve the image quality compared with the usual method of modeling first and scanning later.

Key words microscopy; digital slide scanner; autofocus; tilted camera

1 引言

数字切片扫描仪能对传统的玻璃切片进行扫描成像和无缝拼接,生成包括传统玻璃切片内的所有信息,即整张全视野的数字化切片。数字切片具有传统切片的所有功能,同时不受空间与时间限制,便于存储、阅片、处理等,并可借助计算机及互联网技术实现远程会诊、人工智能辅助分析等,其应用越来越广泛,对其扫描速度和图像质量要求越来越高^[1-3]。图像质量主要受对焦技术的影响^[4],常用的对焦方法就是在 Z 方向拍摄多张图像并根据这些图像的聚焦因子拟合出聚焦曲线,计算出离焦方向和离焦量,由于多次移动 Z 轴,再加上图像采集和处理时间,基本上一次对焦都要 100 ms 到 2 s^[5-8]。而获得一张标本一般要拍摄几千个视野的图像并对其进行拼接,如果每个视野都进行对焦,那扫描一张标本都至少要 10 min,速度太慢。目前

大都采用建模的方法,即在扫描区域范围中找几个视野进行对焦,用这几个视野的焦面位置拟合出整个标本的焦面,常用的典型算法如 Delaunay 三角剖分法,这样大大减少了对焦的次数,同时可以工作在连续扫描模式即扫描摄像头和标本是相对连续运动的,进一步提高了扫描速度。但是预先建立的数学模型不能完全反映扫描过程中的聚焦面,且环境变化都可能会使计算的聚焦面位置 and 实际焦面位置产生偏差,使扫描的数字切片质量降低。为了能在连续扫描过程中实现对焦以提高图像质量,一种方案是引入独立于扫描摄像头的硬件对焦装置,GE 公司在 VL120 扫描仪的成像光路中分出一个光路并设置高速摄像头,在切片移动到下一个视野过程中移动 Z 轴,采集 3 幅图像,并从多幅图像中找出重叠部分以计算离焦量,实现了边扫描边对焦^[5-6],但因为完成一次对焦至少需要 3 幅图像,对焦速度也受到了一定的限制,也就限制了扫描速度。

收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-04-05; 录用日期: 2022-04-14

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ03065103)

通信作者: *mwchen6040@126.com

文献[9]采用摄像头卷帘快门的特点,通过控制曝光与载物台移动的时序,在切片移动到下一个视野过程中至少采集 3 幅沿 Z 轴不同但视野有重叠的图像,用以计算离焦量,但时序控制复杂,计算量也不小。还有其他硬件对焦方法,如三角斜照明法^[10-12]、投影法^[13],只需采集一次数据即可计算焦面,速度更快,但这些只适合于高反射率的标本,不适用于扫描仪常用的带有盖玻片的透明组织标本。近年来出现的计算成像技术可利用具有大景深的低倍率物镜实现高分辨率的显微成像,免去了对焦过程,但还存在视场、空间分辨率、时间分辨率不足等诸多问题^[14-16]。本文提出了一种基于倾斜摄像头的对焦方法,只需拍一张图片即可计算出离焦量,对焦速度更快,可以实现边扫描边对焦,同时能

提高扫描速度和图像质量。

2 基本原理

2.1 基于倾斜摄像头的高速对焦方法

基于倾斜摄像头的对焦方法如图 1 所示。将摄像头与像平面倾斜一定的角度放置,由于倾斜,摄像头每个像素点的像距是不一样的,根据几何光学高斯成像公式,每个像素点对应的物距也不一样,当倾斜摄像头的中心位于成像面时,该点对应的物面就是焦面位置,其两侧的像素点就分别对应物面的焦前和焦后位置。由于像距和物距是一一对应的,因而通过倾斜摄像头获取图像清晰条带位置与中心点的像素偏移量就可以计算出对应物方的离焦量。

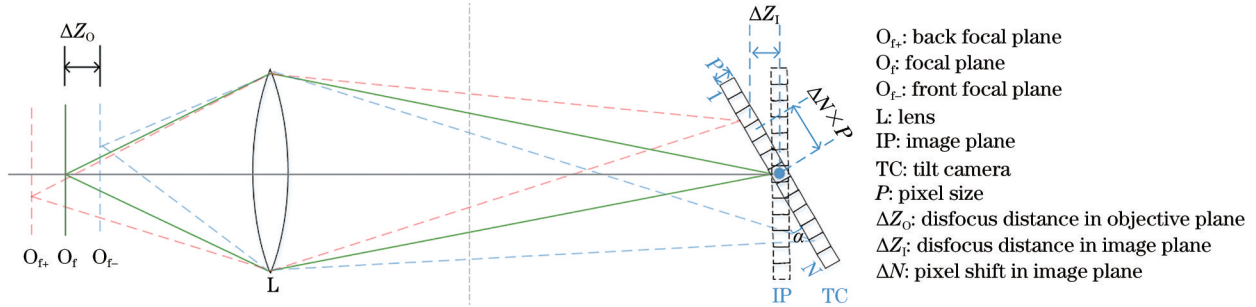


图 1 基于倾斜摄像头的对焦原理

Fig. 1 Auto-focus principle based on the tilt camera

根据几何关系,像素偏移量引起的像距偏移量为

$$\Delta Z_1 = \Delta N \times P \times \sin \alpha, \quad (1)$$

$$\Delta N = k - \frac{N}{2}, \quad (2)$$

式中: ΔN 为清晰条带相对于中心点的像素偏移量; ΔZ_1 为像素偏移量 ΔN 对应的像距偏移量; α 为倾斜摄像头相对像平面的倾斜角度; N 为倾斜摄像头沿倾斜方向的像素数量; P 为像素大小; k 为当前图像清晰条带对应的像素位置,取值为 $1 \sim N$ 。

根据轴向放大率公式,像距偏移量 ΔZ_1 引起的物距偏移量即离焦量 ΔZ_0 为

$$\Delta Z_0 = \frac{\Delta Z_1}{\beta_k^2}, \quad (3)$$

式中: β_k 为当前像素点对应的横向放大倍数。

将式(1)和式(2)代入式(3),可得

$$\Delta Z_0 = \frac{(k - 0.5N) \times P \times \sin \alpha}{\beta_k^2}. \quad (4)$$

由于每个像素点的像距不一样,所以 β_k 不是固定值。但是由于倾斜摄像头引起的像距变化在毫米级别,相对于显微镜的像距即管镜焦距可忽略,故可认为 β_k 不变,即为摄像头不倾斜时的横向放大倍率 β ,则物方离焦量 ΔZ_0 与清晰条带的像素位置 k 的关系为

$$\Delta Z_0 = \frac{(k - 0.5N) \times P \times \sin \alpha}{\beta^2}. \quad (5)$$

2.2 实时跟踪方法

由于只需采集一幅图像并以计算出倾斜图像中清晰条带的位置,计算量很小,选用高速摄像头,这样对焦速度可以足够快,再加上对焦摄像头和扫描摄像头是独立工作的,通过精确的时序控制,确保切片移动到下一个视野之前完成离焦量的计算并驱动 Z 轴到焦面,就可以实现边扫描边对焦,如图 2 所示。

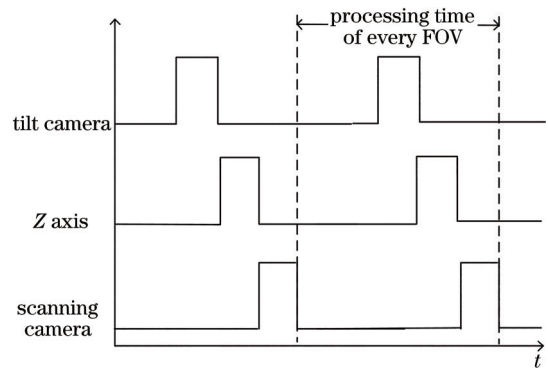


图 2 扫描时序图

Fig. 2 Scanning timing

3 实验方案

3.1 系统组成

在数字切片扫描仪的成像光路中分出一路用以倾斜摄像头进行对焦,如图 3 所示。

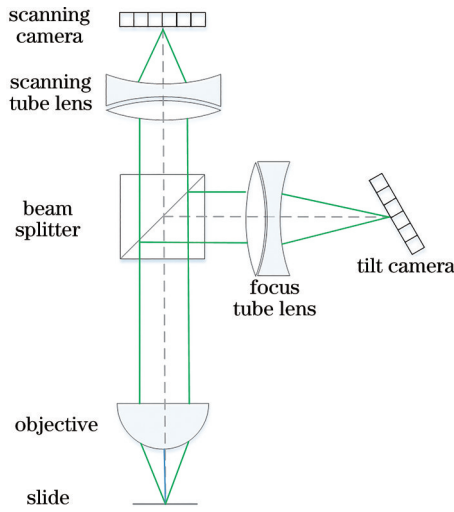


图 3 基于倾斜摄像头的扫描仪实验装置图

Fig. 3 Experimental setup for digital slide scanner based on tilt camera

该倾斜摄像头为 Moticam S1, 分辨率为 1280×960 , 沿长边方向倾斜, 即 N 为 1280, 最高帧率为 240 frame/s, 像素大小 P 为 $3.75 \mu\text{m}$, 倾斜角度 α 为 30° , 采用 $20\times$ 物镜时, $\beta = 6.6$ (含接头倍数)。同时 Z 轴装有 MicroE OPS 高精度的光栅尺, 分辨率为 50 nm 。将这些参数代入式 (5), 可计算出离焦量与清晰条带中心位置的理论关系:

$$\Delta Z_0 = 0.0223k - 14.260 \quad (6)$$

由于景深的存在, 倾斜图像中清晰条带是有一定宽度的。对于式 (6), 有意义的是清晰条带的中心位置 k 而不是宽度。 k 的计算方法: 根据倾斜图像中清晰条带的两边是逐渐模糊的特性, 计算各列的清晰度, 拟合出单峰曲线, 找出峰值, 对应的像素位置就是清晰条带的位置 k 。

需要考虑两个实际情况: 一是照明均匀性的影响, 特别是对焦摄像头是倾斜的, 焦前和焦后的亮度差别更大, 会影响清晰度计算结果的一致性, 需要对

亮度进行归一化; 二是受零件加工及安装影响, 倾斜摄像头的倾斜角度及中心位置与理论存在一定的偏差, 直接用式 (5) 计算会带来误差, 需改用实验方法进行标定。

3.2 亮度的归一化

先拍一张没有放标本时的图像, 调节曝光时间, 确保图片中的最大灰度值接近 255, 每个像素的归一化系数的计算公式为

$$S_{ij} = \frac{g_{\max}}{g_{ij}} \quad (7)$$

式中: S_{ij} 为倾斜图像中像素点 (i, j) 的亮度归一化系数; g_{\max} 为没有放标本时所采集倾斜图像中的最大灰度值; g_{ij} 为倾斜图像中像素点 (i, j) 的灰度值。

得到归一化系数后, 可对放入标本的图像进行归一化, 确保亮度一致, 公式为

$$H_{ij} = S_{ij} * G_{ij} \quad (8)$$

式中: G_{ij} 为有标本时所采集图像的像素点 (i, j) 的灰度值; H_{ij} 为归一化后像素点 (i, j) 的灰度值。

3.3 清晰条带位置的计算

计算倾斜图像每一列的清晰度 R_i 的方法: 先通过计算某列上某一像素点 (i, j) 与其同列相邻像素点 $(i, j-1)$ 、 $(i, j+1)$ 之间的灰度差平方和的开方来计算像素点 (i, j) 处的清晰度, 之后通过对 i 列各像素点清晰度求和得到该列的清晰度, 表达式为

$$R_i = \frac{\sum_{j=2}^{M-1} \sqrt{(H_{ij} - H_{i,j-1})^2 + (H_{ij} - H_{i,j+1})^2}}{M - 2} \quad (9)$$

式中: M 表示摄像头的最大行数。

计算每列的清晰度后, 得到一组数据 (i, R_i) , $i = 1, 2, \dots, 1280$, 构成清晰度-像素散点图, 如图 4 所示, 可以采用一个单峰对称曲线对其进行拟合。将拟合所得的曲线峰值位置作为清晰条带的位置。常用的拟合曲线有抛物线、高斯曲线和 Lorenz 曲线等, 其中 Lorenz 曲线的峰值较陡, 精度会更高, 因此采用 Lorenz

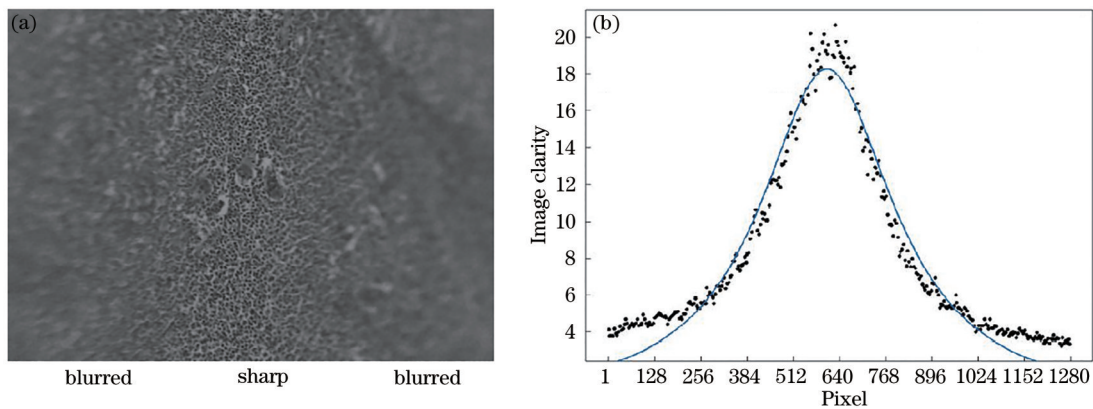


图 4 倾斜面图像及清晰度-像素点 Lorenz 拟合曲线。(a) 倾斜面图像; (b) 清晰度-像素点 Lorenz 拟合曲线

Fig. 4 Tilt plane image and Lorenz fitting curve of sharpness-pixel scatter

曲线进行拟合, 结果为

$$L(i) = \frac{2.27}{\left[\left(1 - \frac{i}{640} \right) - 0.0547 \right]^2 + 0.1243} \quad (10)$$

3.4 离焦量的标定

放入标本, 利用扫描摄像头找到焦面并以此时的 Z 轴位置作为参考点。摄像头分别沿上、下两个离焦方向按一定的间隔运动, 并用光栅尺记录每次运动后离参考点的距离, 作为实际离焦量, 同时采集倾斜图像并计算出清晰条带的像素位置 k , 绘制出离焦量-像素散点图, 并进行线性拟合, 结果如图 5 所示, 表达式为

$$\Delta Z_0 = 0.0215k - 14.506 \quad (11)$$

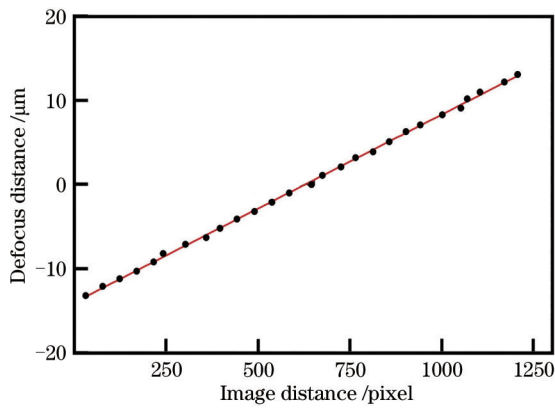


图 5 离焦量-像素散点图及线性拟合图

Fig. 5 Defocus distance-pixel scatter and linear fitting curve

4 性能测试

基于倾斜摄像头的数字切片扫描装置如图 6 所示, 以组织标本作为测试样本, 并使用常用的 APO 物镜 $20\times/0.75$ 作为物镜, 测试倾斜摄像头的对焦性能和速度, 以及整机的扫描性能。

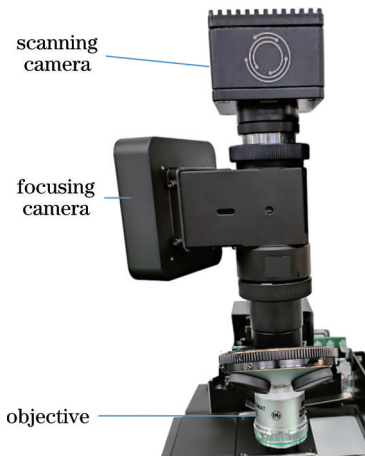


图 6 基于倾斜摄像头的数字切片扫描装置

Fig. 6 Experimental setup for digital slide scanner based on tilt camera

4.1 对焦性能测试

对焦性能包括对焦范围和对焦误差两方面。其中对于实际对焦范围, 根据 3.4 节的离焦量标定方法, 测得对焦范围为 $-13.1\sim 13.5\ \mu\text{m}$, 小于式 (6) 计算的理论对焦范围 $-14.26\sim 14.28\ \mu\text{m}$, 主要是因为要拟合单峰曲线, k 无法取极值 1 和 1280。

对焦误差的测试方法: 在实际对焦范围内以 $1\ \mu\text{m}$ 的离焦量间隔将载物台调整至不同的测试离焦量的位置, 并使用光栅尺读取测试离焦量的数值作为实测离焦量 ΔZ_m , ΔZ_m 与计算的离焦量 ΔZ_c 的差值记为 ΔZ_e , 将 ΔZ_e 作为系统的离焦量误差。数据如表 1 所示。

表 1 对焦误差测试实验数据

Table 1 Experimental data of focusing error unit: μm

ΔZ_m	ΔZ_c	ΔZ_e	ΔZ_m	ΔZ_c	ΔZ_e
13.05	12.31	0.74	-1.15	-0.83	-0.37
12.15	11.5	0.65	-2.05	-1.77	-0.28
11.05	10.4	0.65	-2.95	-2.58	-0.37
10.05	9.51	0.54	-4.05	-3.78	-0.27
9.05	8.42	0.63	-5.15	-5.03	-0.12
7.95	7.64	0.31	-6.05	-5.91	-0.14
7.05	6.61	0.44	-7.05	-6.58	-0.47
6.05	5.59	0.46	-8.15	-7.78	-0.37
5.10	4.75	0.35	-9.05	-8.52	-0.53
4.15	3.94	0.21	-10.05	-9.43	-0.62
3.05	2.86	0.19	-11.15	-10.62	-0.53
2.05	1.67	0.38	-12.05	-11.41	-0.64
1.15	1.02	0.13	-13.10	-12.25	-0.85
0.05	0.12	-0.07			

从表 1 可以看出, $\pm 8\ \mu\text{m}$ 范围外的对焦误差比较大, 超过 $20\times/0.75$ 物镜的景深 $1\ \mu\text{m}$, 因此有效对焦范围减小到 $-8.0\sim 8.0\ \mu\text{m}$, 不过实际组织切片的标准厚度为 $6\ \mu\text{m}$, 可以满足实际应用。之所以有效对焦范围减少这么多, 与靠近倾斜边缘部分的像差及倍数偏差比较大有关, 因此倾斜相机的角度要比理论值大, 以确保有效对焦范围能满足实际需求。

在测试中部分视野的离焦量会计算失败, 发现这些视野的组织非常稀疏, 无法拟合出完整的 Lorenz 曲线, 如图 7(b) 所示。

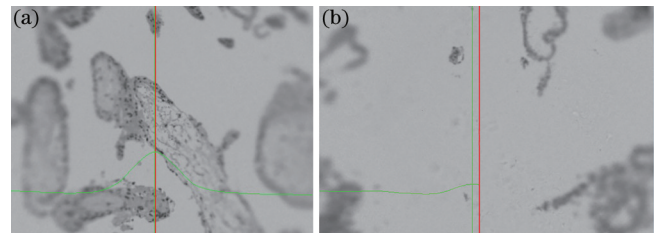


图 7 对焦成功和失败的情形。(a) 对焦成功; (b) 对焦失败

Fig. 7 Cases of successful and failure focusing. (a) Case of successful focusing; (b) case of failure focusing

4.2 离焦量的计算时间

离焦量的计算时间是从倾斜摄像头开始采集图像到计算出离焦量的时间,调用 Windows 系统具有 μs 级精度的 QueryPerformanceCounter(\cdot) 函数来统计^[17],测量 30 次取平均,结果为 12.1 ms。

4.3 扫描性能测试

鉴于该对焦方法不适合样品非常稀疏的情况,在组织标本中不可避免地存在局部稀疏的位置,需要有应对办法。这里采用局部建模法解决,即用邻近视野的已知焦面位置建立一个局部聚焦表面模型来计算出当前视野的聚焦位置,由于用相邻视野的坐标建模,相当于建模点更为精细,其准确度比传统的建模法更高,具体流程如图 8 所示。

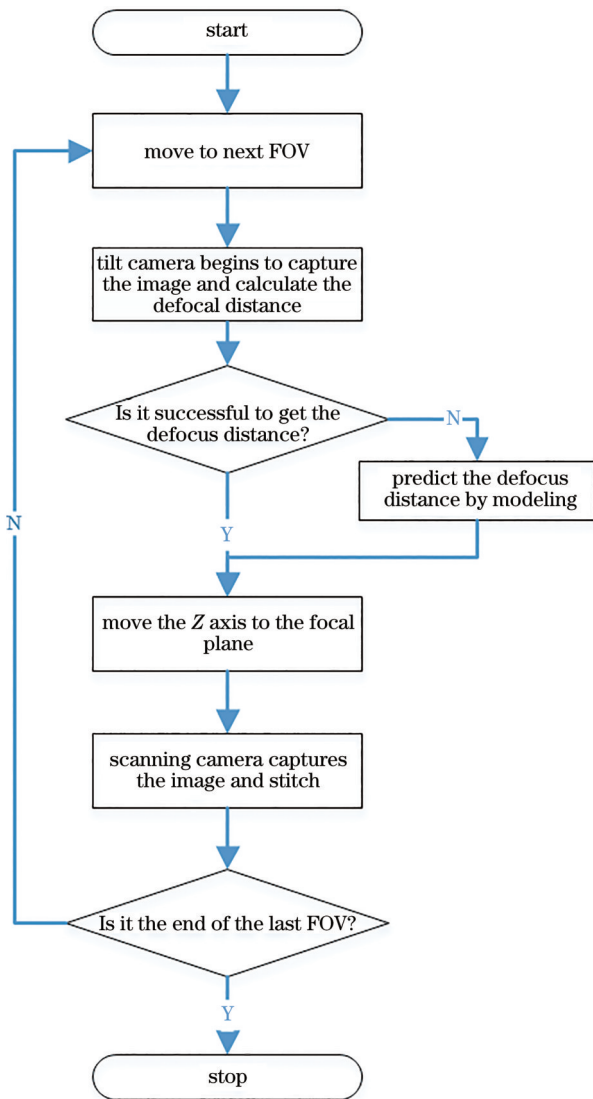


图 8 扫描和实时对焦流程

Fig. 8 Flow chart of the scanning and real-time focusing

用传统的建模方法和实时跟踪焦面方法分别对同一标本进行 3 次扫描,对比平均的扫描时间和图像质量。在扫描时间方面,前者平均为 120 s,后者为 90 s,主要原因在于实时跟踪焦面方法省去了建模的时间。

传统对焦方法对每个点建模需要 1 s 左右,一般需要 25 个建模点,所以实时跟踪焦面方法可以节省近 30 s 的时间。在图像质量方面,前者有部分视野较为模糊,两者的清晰度因子分别为 13.7303 和 15.2466,如图 9 所示。此结果表明实时跟踪焦面方法可以同时提高扫描速度和图像质量。

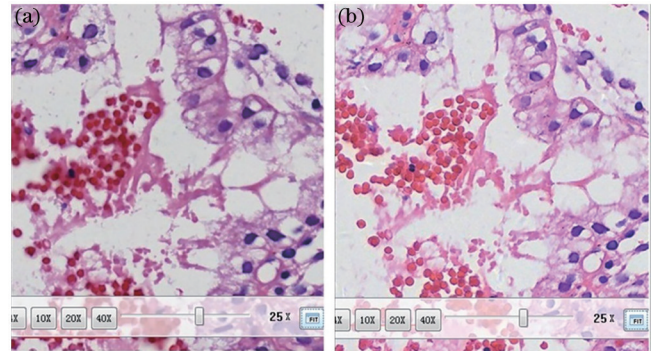


图 9 两种方法获取的数字切片比较。(a)基于传统建模方法获取的数字切片;(b)基于实时动态对焦方法获取的数字切片

Fig. 9 Digital slide comparison of two kinds of methods. (a) Digital slide based on traditional modeling method; (b) digital slide based on real-time dynamic focusing method

5 结 论

提出的基于倾斜摄像头实现对焦的方法避免了传统方法需采集多幅图像计算焦面导致速度慢的问题,只需采集一幅图像进行计算,再配合高速摄像头,使对焦速度大大提高,可以达到 10 ms 级别,用于数字切片扫描仪时可省去建模时间,同时可以在扫描过程中实时动态对焦,也提高了图像质量,实现也简单,具有很强的实用价值。所提方法已经应用在麦克奥迪实业集团有限公司的 EasyScan 系列数字切片扫描仪上,也可以移植到显微镜上。后续还可以在两方面开展研究:一是对焦速度方面,可以采用更高速的摄像头作为对焦摄像头,再配合高性能显卡和计算机技术,有望实现 ms 级别的对焦;二是对焦准确性方面,研究能兼容组织稀疏的标本的对焦算法,以实现全切片的实时对焦。

参 考 文 献

- [1] Iyengar J N. Whole slide imaging: the futurescape of histopathology[J]. Indian Journal of Pathology & Microbiology, 2021, 64(1): 8-13.
- [2] Pantanowitz L, Valenstein P N, Evans A J, et al. Review of the current state of whole slide imaging in pathology[J]. Journal of Pathology Informatics, 2011, 2: 36.
- [3] Hanna M G, Parwani A, Sirintrapun S J. Whole slide imaging: technology and applications[J]. Advances in Anatomic Pathology, 2020, 27(4): 251-259.

- [4] Xiang Y, He Z J, Liu Q, et al. Autofocus of whole slide imaging based on convolution and recurrent neural networks[J]. *Ultramicroscopy*, 2021, 220: 113146.
- [5] Montalto M C, McKay R R, Filkins R J. Autofocus methods of whole slide imaging systems and the introduction of a second-generation independent dual sensor scanning method[J]. *Journal of Pathology Informatics*, 2011, 2: 44.
- [6] Montalto M, McKay R, Baxi V. The accuracy of dynamic predictive autofocusing for whole slide imaging [J]. *Journal of Pathology Informatics*, 2011, 2(1): 38.
- [7] 姜志国, 韩冬兵, 袁天云, 等. 基于全自动控制显微镜的自动聚焦算法研究[J]. *中国图象图形学报*, 2004, 9(4): 396-401.
Jiang Z G, Han D B, Yuan T Y, et al. Study on auto focusing algorithm for automatic microscope[J]. *Journal of Image and Graphics*, 2004, 9(4): 396-401.
- [8] 江旻珊, 闫瑾, 徐晓立, 等. 改进的人工鱼群算法在显微镜自动对焦中的应用[J]. *光电工程*, 2018, 45(12): 180236.
Jiang M S, Yan J, Xu X L, et al. Applications of improved artificial fish swarm algorithm in microscopy autofocus[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2018, 45(12): 180236.
- [9] Fumio I, Masatoshi O. Image acquisition device and method and system for creating focus map for specimen: US10348954B2[P]. 2017-01-04.
- [10] Liu C S, Jiang S H. Precise autofocusing microscope with rapid response[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2015, 66: 294-300.
- [11] Rhee H G, Kim D I, Lee Y W. Realization and performance evaluation of high speed autofocusing for direct laser lithography[J]. *The Review of Scientific Instruments*, 2009, 80(7): 073103.
- [12] 张小波, 范富明, 程良伦. 激光三角法改进的显微镜快速自动对焦方法[J]. *红外与激光工程*, 2012, 41(7): 1784-1791.
Zhang X B, Fan F M, Cheng L L. Improvement for fast auto-focus system using laser triangulation[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2012, 41(7): 1784-1791.
- [13] 刘璐, 闫佩正, 但西佐, 等. 基于条纹投影的显微镜自动对焦研究[J]. *光学学报*, 2019, 39(8): 0818001.
Liu L, Yan P Z, Dan X Z, et al. Microscope autofocus research based on stripe projection[J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(8): 0818001.
- [14] 毛海锋, 赵巨峰, 崔光芒, 等. 基于傅里叶叠层显微成像的 LED 阵列位置校正方法[J]. *光学学报*, 2021, 41(4): 0411002.
Mao H F, Zhao J F, Cui G M, et al. LED array position correction method based on Fourier ptychographic microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(4): 0411002.
- [15] 张芬, 周业倩, 尤栖冲, 等. 加权切趾传递函数约束的傅里叶叠层显微成像[J]. *光学学报*, 2021, 41(4): 0411001.
Zhang F, Zhou Y Q, You X C, et al. Fourier ptychographic microscopy based on a weighted apodized transfer function constraint[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(4): 0411001.
- [16] 张瑾华, 张继洲, 李佳男, 等. 基于叠层衍射成像的傅里叶叠层显微像差校正方法[J]. *光学学报*, 2021, 41(10): 1011001.
Zhang J H, Zhang J Z, Li J N, et al. Aberration correction of Fourier ptychographic microscopy based on ptychographical iterative engine[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(10): 1011001.
- [17] QueryPerformanceCounter function (profileapi.h) [EB/OL]. (2021-10-13)[2022-01-01]. <https://docs.microsoft.com/en-us/windows/win32/api/profileapi/nf-profileapi-queryperformancecounter>.