

文章编号 1004-924X(2008)01-0166-06

# 基于加权邻域相关性的显微镜自动聚焦函数

王 倩, 宋恩民, 许向阳, 刘 宏

(华中科技大学 计算机学院, 湖北 武汉 430074)

**摘要:**提出了一种基于加权邻域相关性的显微镜自动聚焦函数,并在研究显微镜聚焦原理及成像过程的基础上,分析了显微镜图像中像素邻域灰度相关性及像散现象对聚焦评价的影响。首先,分别计算每幅显微镜序列图像中各像素与其四邻域像素的灰度相关性。然后,计算基于此相关性加权平均值的二次多项式聚焦函数,其中的权值则根据对应像素与显微镜视场中心的距离来确定。最后,选取该函数值最大的图像为聚焦图像。实验结果表明,与经典的聚焦函数(如方差函数、绝对梯度函数、Roberts 梯度函数及 Tenengrad 函数)相比,本文方法的聚焦灵敏度因子提高了 0.318 5~0.326 8,噪声环境下聚焦的平均正确率提高了 0%~40%。该方法能够准确地评价图像聚焦的程度,并具有较高的灵敏度和较强的抗噪性。

**关 键 词:**显微镜;自动聚焦算法;相关性;像散

**中图分类号:**TH742.9;TP391.4 **文献标识码:**A

## Auto-focusing function for microscope image based on weighted neighborhood correlation

WANG Qian, SONG En-min, XU Xiang-yang, LIU Hong

(School of Computer Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** A new auto-focusing function for microscope image based on weighted neighborhood correlation is presented, and the effect of pixel neighborhood grey level correlation and astigmatism in microscope image on the focusing results is analyzed based on the research of focusing principle and imaging processing. The 4-neighborhood grey level correlation of each pixel for every image in the focusing processing is computed. Then a quadratic polynomial focusing evaluation function, weighted average value based on the correlation, is calculated, and the weights are decided by the distance between the corresponding pixel and the image center. Finally, the image with the maximum function value is selected as the focusing image. The experimental results indicate that the focusing sensitivity factor increases by 0.318 5~0.326 8, and the focusing correct rate improves by 0%~40% under the noise conditions compared with the classical method. This method can accurately estimate the focusing extents with high sensitivity and strong noise immunity.

**Key words:** microscope; auto-focusing algorithm; correlation; astigmatism

收稿日期:2007-07-02;修订日期:2007-08-20.

基金项目:国家 863 高技术计划资助项目(No. 2006AA02Z347)

## 1 引 言

光学显微镜是利用光学原理将人眼所不能分辨的细胞、病毒等微小物体放大,以供人们认识物质微观世界的光学仪器。目前,它已经广泛用于生物工程、医学、农学、物理学、化学、材料学、工业制造及地质考古等领域的检测与分析<sup>[1]</sup>。随着这些技术领域的飞速发展,人工观测分析的方式已经无法适应急剧增大的信息量的现状,显微图像的自动采集、分析已成为必然趋势。

实现高精度的自动聚焦是显微镜自动化的首要问题之一,其关键是确定评价聚焦程度的量化函数。聚焦程度视觉上是靠图像的清晰程度来衡量的,图像越清晰所包含的边缘细节信息越多。图像的边缘在空域中就是灰度变化明显的地方,而在频域中表现为高频分量<sup>[2]</sup>。根据这些特点,自动聚焦评价函数可分为时域和空域两类<sup>[3]</sup>。目前已经提出的经典的空域类函数有方差函数<sup>[2,4-6]</sup>、梯度函数<sup>[2,5-7]</sup>(平方梯度函数、绝对梯度函数、Roberts 梯度函数、Sobel 梯度函数、Brenner 函数、Tenengrad 函数)及灰度熵函数<sup>[7-9]</sup>等;频域类函数是把图像转化到频域中求其高频分量的含量,基本的频域转化方法是 DCT 变换、傅里叶变换和小波变换<sup>[2,5,10-11]</sup>。

本文提出了基于像素邻域自相关的聚焦评价函数,实验结果表明,与经典的聚焦评价函数相比,该方法具有更高的灵敏度和更强的抗噪性。

## 2 显微图像聚焦原理及像素邻域相关性分析

显微镜是通过透镜对光线的折射进行成像的,图 1 为显微镜图像成像原理图。

在显微镜成像过程中物平面(样本切片)上每一个点  $P$  发出的全部光线,经过透镜折射后仍交于一点  $Q$ ,即每一个物点对应于一个像点,所有物点组成该物平面的聚焦平面<sup>[1-2]</sup>。若观察面(显微图像成像平面)刚好位于聚焦平面,则可获得清晰的显微图像,此时称为聚焦;若观察面偏离了聚

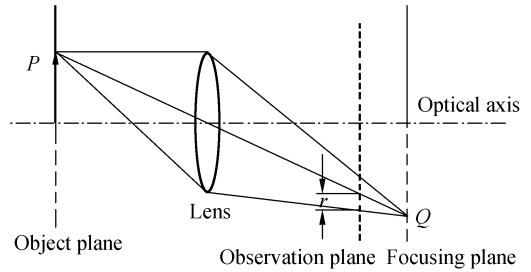
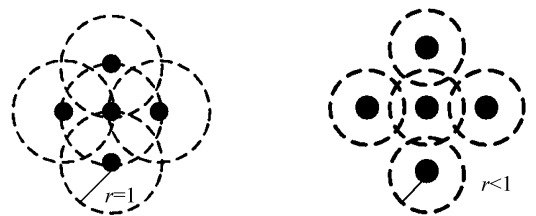


图 1 显微镜成像原理图

Fig. 1 Principle of microscope imaging

焦平面,则每个物点在观察面上形成一个半径为  $r$  的圆斑,这时产生了离焦现象, $r$  的大小可以表征图像的聚焦程度。 $r$  越大,观察面离聚焦平面越远; $r$  越小,则观察面越靠近聚焦平面<sup>[2,12]</sup>,当  $r = 1$  pixel(以下记为 1)时,聚焦精度可达像素级。分析观察面成像中各像素亮度形成的情况:当圆斑半径为 1 时,在观察面成像中每个像素的灰度值由以该像素的四邻域像素为圆心的圆斑叠加而成,如图 2 (a)所示,这导致观察成像平面的像素点与其四邻域像素相互影响、高度相关。当  $r$  增大时,这种相关性扩散到该像素的  $r$  半径邻域内的所有像素,且几何距离越近的像素其相关性越大。因此,观察面成像中每个像素与其某个邻域内的像素,特别是四邻域像素的相关性可以反映图像的聚焦程度,相关性越大表明聚焦程度越低,反之则聚焦程度越高。当该像素与其四邻域像素的相关性最小时,表明  $r < 1$  pixel,以各像素为中心的圆斑在像素所在位置不会交叠,如图 2(b)所示,此时聚焦精度可高于像素级。



(a) 离焦圆斑 (b) 聚焦圆斑  
(a) Defocusing faculae (b) Focusing faculae

图 2 圆斑叠加图

Fig. 2 Overlapping faculae

聚焦精度不仅和显微图像的分辨率有关,还与聚焦区域的选择有关。根据显微成像的特点,当视场很大时,靠近视场边缘的物点离光轴远,光束倾斜大,经透镜折射后会引引起像散,像散会使物点的成像形成一个椭圆的斑点,影响外围图像的清晰度<sup>[1,13-14]</sup>。为了减少像散对聚焦精度的影响,可将聚焦区域尽量靠近视场中心。

### 3 基于像素邻域相关性的聚焦评价函数

#### 3.1 像素邻域平均相关系数

若显微镜图像  $f$  大小为  $M \times N$ , 计算显微镜图像中像素  $(i, j)$  与其四邻域像素  $D_{i,j}$  的平均相关系数<sup>[15]</sup>为

$$p = \frac{\sum_{i=2}^{M-1} \sum_{j=2}^{N-1} \frac{1}{4} \times \sum_{d \in D_{i,j}} [f(i, j) \times f(d)]}{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N f(i, j)^2} \quad 0 < p \leq 1. \quad (1)$$

令

$$q = (1 - p)^2, \quad (2)$$

当  $q$  越小, 则说明图像中像素与其邻域像素的相关性越大, 即有半径越大、数目越多的离焦圆斑在该像素处叠加, 此时聚焦程度越低; 当  $q$  越大, 则像素与其邻域像素的相关性越小。当  $q$  取最大值时, 在各像素处无离焦圆斑叠加, 即离焦圆斑半径  $< 1$ , 可达到高于像素级的聚焦精度。 $q$  在  $[0, 1]$  上为单峰函数且与图像的聚焦程度具有无偏性, 因此式(2)可作为聚焦的评价函数。

#### 3.2 像素邻域加权平均相关系数

由第 2 节的分析可知, 为了减少像散现象对聚焦精度的影响, 应尽量选择靠近视场中心的像素计算聚焦评价函数。因此, 可根据像素到图像中心的距离确定其参与聚焦评价函数计算的权重。像素  $f(i, j)$  对应的权重

$$\omega_{i,j} = \begin{cases} \frac{1}{1 + \sqrt{(i-i_c)^2 + (j-j_c)^2}} & \sqrt{(i-i_c)^2 + (j-j_c)^2} \leq R \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}, \quad (3)$$

其中  $(i_c, j_c)$  为视场中心的坐标,  $R$  为给定的聚焦区域半径。

若显微镜图像  $f$  大小为  $M \times N$ , 计算显微镜图像中所有像素与其四邻域像素的加权平均相关系数为

$$p_w = \frac{\sum_{i=2}^{M-1} \sum_{j=2}^{N-1} \frac{1}{4} \times \omega_{i,j} \times \sum_{d \in D_{i,j}} [f(i, j) \times f(d)]}{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \omega_{i,j} \times f(i, j)^2} \quad 0 < p_w \leq 1. \quad (4)$$

令

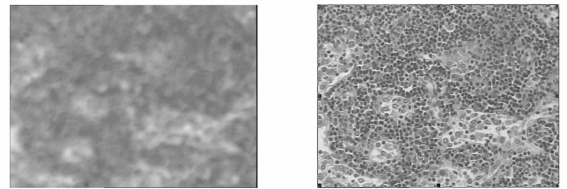
$$q_w = (1 - p_w)^2, \quad (5)$$

为对应的聚焦评价函数。

## 4 实验

为了评估基于像素邻域相关性的聚焦评价函数的性能, 本文对该聚焦函数与经典的聚焦函数如方差函数、绝对梯度函数、Roberts 梯度函数及 Tenengrad 函数进行了聚焦灵敏度与抗噪性的比较。实验分为以下三个阶段。

(1) 实验图像的采集。在手动调焦过程中, 对同一观测对象, 采集从离焦到聚焦, 再从聚焦到离焦的序列显微图像, 共 5 组, 其中离焦图像与聚焦图像如图 3 所示, 显微图像的视场大小为  $768 \times 576$ , 视场中心位于图像中心。



(a) 离焦图像 (b) 聚焦图像  
(a) Defocusing image (b) Focusing image

图 3 显微图像

Fig. 3 Microscope images

(2) 聚焦灵敏度评估。对每一组图像用上述的各种聚焦函数进行评价, 并将各函数值分别归一化到  $[0, 1]$ , 其中一组图像对应的评价函数曲线如图 4(a) 所示, 该组图像的聚焦图像为第 9 幅。

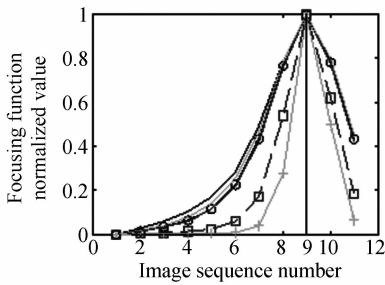
从图 4(a)可以看出,基于像素邻域相关性函数曲线满足聚焦评价函数无偏性及单峰性的要求,并且曲线在峰值处形状尖锐,其峰值处对应聚焦图像。与经典的聚焦函数如方差函数、绝对梯度函数、Roberts 梯度函数及 Tenengrad 函数相比,曲线在峰值附近的变化更加显著。为了精确描述和比较各种方法的聚焦灵敏度,分别计算各方法在每组聚焦图像中的聚焦灵敏度因子  $s$

$$s = (2 \times v(t) - v(t-1) - v(t+1)) / 2, \quad (6)$$

其中,  $v(i)$  为显微序列图像中第  $i$  幅图像对应的聚焦函数值,  $t$  为该组中聚焦图像的序号。聚焦灵敏度因子计算结果如表 1 所示,可以看出邻域相关性的方法较其它方法具有更高的聚焦灵敏度因子,其中加权邻域相关性函数由于考虑了像散现象对聚焦精度的影响,聚焦灵敏度最高,其平均

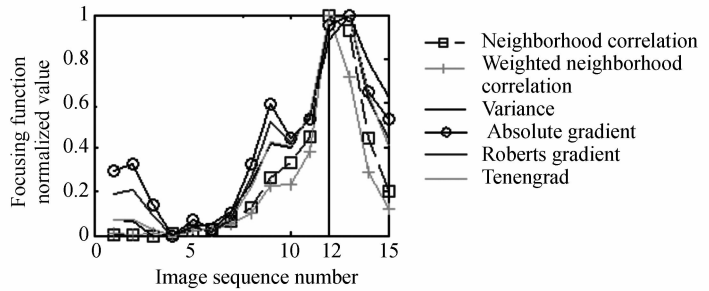
灵敏度因子相对于传统方法提高了 0.318 5 ~ 0.326 8。

(3)抗噪性分析。依据显微图像形成噪声的原因,在原序列图像上加上 1% 的斑点噪声,对加噪图像用与步骤(2)同样的方法进行聚焦函数灵敏度评估。其中一组加噪图像对应的不同聚焦函数的曲线如图 4(b)所示。实验表明,邻域相关性与加权邻域相关性函数能够准确定位聚焦图像,而方差函数、绝对梯度函数及 Tenengrad 函数检测到的聚焦图像有一定偏差,其结果如表 2 所示。以人工观测的聚焦结果为标准,本文方法的平均聚焦正确率较其它方法提高了 0% ~ 40%。同样由图 4(b)可知,邻域相关性与加权邻域相关性函数受噪声影响较小,能够保持单峰性,具有较好的抗噪性。



(a) 原图像(聚焦图像第 9 幅)

(a) Original image(focusing image 9)



(b) 加噪图像(聚焦图像第 12 幅)

(b) Noise injection image(focusing image 12)

图 4 聚焦函数曲线图

Fig. 4 Curves of focusing function

表 1 聚焦灵敏度因子

Tab. 1 Focusing sensitivity factors of the original images

Groups	Neighborhood correlation	Weighted neighborhood correlation	Variance	Absolute gradient	Roberts gradient	Tenengrad
1	0.354 1	0.595 5	0.165 1	0.197 1	0.200 7	0.159 5
2	0.463 5	0.674 1	0.177 3	0.236 5	0.247 4	0.221 5
3	0.263 6	0.478 7	0.242 9	0.161 1	0.165 5	0.144 1
4	0.422 1	0.613 0	0.207 9	0.228 0	0.232 2	0.210 6
5	0.095 9	0.131 2	0.065 4	0.052 6	0.054 4	0.048 8
Average	0.319 8	0.498 5	0.171 7	0.175 1	0.18	0.156 9

表 2 加噪图像聚焦结果(表中的数据为聚焦图像的序号)

Tab. 2 Focusing results of the noise injection images (the data indicate the focusing image sequence numbers)

Groups	Artificial observation	Neighborhood correlation	Weighted neighborhood correlation	Variance	Absolute gradient	Roberts gradient	Tenengrad
1	9	9	9	9	9	9	9
2	15	15	15	15	15	15	15
3	12	12	12	13	13	12	13
4	7	7	7	5	5	7	7
5	10	10	10	10	10	10	10
Correct rate	100%	100%	100%	60%	60%	100%	80%

## 5 结 论

本文在研究了显微镜光学成像原理的基础上,提出了一种自动聚焦评价函数。该函数通过计算图像中各像素四邻域的相关性对图像聚焦的程度进行了评价。同时,本文考虑了显微镜成像过程中的像散现象对聚焦精度的影响,在聚焦评价函数中根据每个像素距视场中心的距离对该像

素进行了加权。实验分为聚焦函数的灵敏度分析和抗噪性分析两部分,与目前经典的聚焦评价函数相比,本文聚焦评价函数的平均灵敏度因子提高了 0.318 5~0.326 8,噪声环境下聚焦的平均正确率提高了 0%~40%,具有较高的聚焦灵敏度和较好的抗噪性。

致谢:向为本文提供实验图像及有关指导的华中科技大学机械学院唐立新副教授表示感谢!

## 参考文献:

- [1] 舍英,伊力奇,呼和巴特尔. 现代光学显微镜[M]. 北京:科学出版社,1997.  
SHE Y, YI L Q, HUHE B T E. *Modern Optical Microscope* [M]. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)
- [2] 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]. 中国图像图形学报, 2004, 9(4): 396-401.  
JIANG ZH 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. (in Chinese)
- [3] 姜志国,韩冬兵,谢凤英. 基于全自动显微镜的图像新技术研究[J]. 中国体视学与图像分析, 2004, 9(1): 31-36.  
JIANG ZH G, HAN D B, XIE F Y. New image techniques based on automatic microscopy [J]. *Chinese Journal of Stereology and Image Analysis*, 2004, 9(1): 31-36. (in Chinese)
- [4] PECH P J L, CRISTBAL G. Diatom autofocusing in brightfield microscopy: a comparative study [C]. *International Conference on Pattern Recognition (ICPR00)*, Barcelona, Spain, 2000: 314-317.
- [5] 李奇,冯华君,徐之海,等. 数字图象清晰度评价函数研究[J]. 光子学报, 2002, 31(6): 736-738.  
LI Q, FENG H J, XU ZH H, *et al.*. Digital image sharpness evaluation function[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, 31(6): 736-738. (in Chinese)
- [6] 赵辉,鲍歌堂,陶卫. 图像测量中自动调焦函数的实验研究与分析[J]. 光学 精密工程, 2004, 12(5): 531-536.  
ZHAO H, BAO G T, TAO W. Experimental research and analysis of automatic focusing function for imaging measurement [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004, 12(5): 531-536. (in Chinese)
- [7] 方以,郑崇勋,闫相国. 显微镜自动聚焦算法的研究[J]. 仪器仪表学报, 2005, 26(12): 1275-1277.  
FANG Y, ZHENG CH X, YAN X G. Research on auto-focused algorithm for microscope [J]. *Chinese Journal of*

*Scientific Instrument*, 2005, 26 (12):1275-1277. (in Chinese)

- [8] 朱铮涛,黎绍发,陈华平.基于图像熵的自动聚焦函数研究[J]. 光学 精密工程,2004,12(5):537-542.  
ZHU ZH T, LI SH F, CHEN H P. Research on auto-focused function based on the image entropy [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004, 12(5):537-542. (in Chinese)
- [9] 康宗明,张利,谢攀.一种基于能量和熵的自动聚焦算法[J]. 电子学报,2003,31(4):552-555.  
KANG Z M, ZHANG L, XIE P. Implementation of an automatic focusing algorithm based on spatial high frequency energy and entropy [J]. *Acta Electronica Sinica*, 2003, 31(4):552-555. (in Chinese)
- [10] CHARFI M, NYECK A, TOSSER A. Focusing criterion[J]. *Electronics Letters*, 1991, 27(14):1233-1235.
- [11] 王义文,刘献礼,谢晖.基于小波变换的显微图像清晰度评价函数及 3-D 自动调焦技术[J]. 光学 精密工程,2006, 14(6):1063-1069.  
WANG Y W, LIU X L, XIE H. A wavelet-based focus measure and 3-D autofocusing for microscope images [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2006, 14(6):1063-1069. (in Chinese)
- [12] 吕退东,黄心汉,王敏,等.基于显微图像散焦特征的微操作机器人深度信息提取[J]. 机器人,2003,25(4):322-326.  
LV X D, HUANG X H, WANG M, *et al.*. Micromanipulation robot depth extraction based on micro image defocus feature[J]. *Robot*, 2003, 25(4):322-326. (in Chinese)
- [13] 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[J]. 光子学报,2003, 32(12):1499-1501.  
LI Q, FENG H J, XU ZH H. Autofocus system experiment study using variational image-sampling [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, 32(12):1499-1501. (in Chinese)
- [14] ZHU K F, WEI J, GAO Z, *et al.*. Using non-uniform sampling to make automatic focusing result correct[C]. *IEEE International Symposium on Microwave, Antenna, Propagation and EMC Technologies for Wireless Communications Proceedings*. 2005. 1264-1266.
- [15] HU M H, SHAO H H. Autoregressive spectral analysis based on statistical autocorrelation [J]. *Physica A*, 2007, 376:139-146.

**作者简介:**王 倩(1981—),女,湖北恩施人,博士研究生,主要研究方向为生物医学图像处理与分析、模式识别等。E-mail:icedlitchi@163.com

**通讯作者:**宋恩民(1962—),男,江西人,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为生物医学图像分析与处理、快速近似算法及算法复杂性等。E-mail: esong@mail.hust.edu.cn