

Automatización de microscopio digital mediante servomotor para autoenfoco

Pablo Reyes¹, Héctor Quiriarte¹, Santiago Tello-Mijares^{1,*}, Jesús Linares¹.

Resumen—Este trabajo presenta la automatización de un microscopio Micro-Science, mediante el diseño en NX y fabricación en torno de un acoplador para un servomotor Power Pro MG995, y lograr el autoenfoco adecuado con el objetivo de capturar imágenes de una muestra biológica. Además se comparan dos de los principales métodos de autoenfoco: utilizando como medida de enfoque la Varianza (V); y como algoritmos de auto-enfoco Búsqueda Global (Global Search, GS) y Búsqueda del pico más alto (Hill climb search, HCS). Presentando mejores resultados el método GS-V.

Palabras claves—Diseño en NX, método de Autoenfoco, Varianza, Búsqueda Global, Búsqueda del pico más alto.

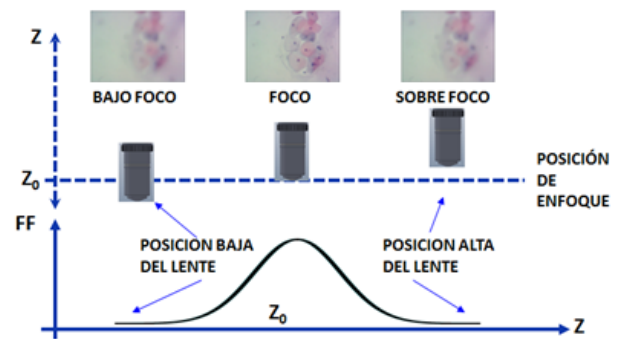


Figura 1. Método de Autoenfoco, posición de la lente del microscopio.

XXII. INTRODUCCIÓN

Un enfoque correcto es una característica esencial de calidad para las imágenes adquiridas en un sistema de visión artificial [1], así como un paso crítico en la captura automática de imágenes microscópicas [2]. El contexto de este trabajo es automatizar un microscopio que capture cientos de imágenes a partir de una muestra de Coprinus mushroom set c.s. [1].

Un método de AF implica dos operaciones: 1) la medida o el valor del nivel de enfoque en una imagen que se evalúa como una función de la posición o separación de la lente, generando así una función de enfoque (FF, Focus Function); 2) el algoritmo de búsqueda que mueve la lente tratando de encontrar el mejor valor de la FF [5] (Figura 1). Los sistemas de AF han sido ampliamente discutidos en las referencias del estado del arte [1, 2, 4]-[22].

Los trabajos desarrollados se han ocupado de lidiar ya sea con la evaluación de diferentes medidas de enfoque [1, 2, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15] o determinando los algoritmos de AF óptimos [4, 5, 8, 9, 16, 17, 20, 21, 22]. Algunos de estos trabajos se han centrado en las imágenes microscópicas [1, 2, 6, 7, 10, 11, 18, 19]. Estos trabajos han considerado el movimiento del eje Z en el microscopio para el AF, pero no han tomado en cuenta o discutido la aplicación del escaneo de la lente en los ejes

XY para capturar imágenes de forma secuencial.

La organización de este artículo es: sección 1 se presenta el estado del arte de sistemas autoenfoco para microscopios; en la sección 2 el diseño y fabricación del acoplador, la implementación de los métodos de autoenfoco *Global search* con varianza (GS-V) y *Hill climb search* con varianza (HCS-V); la sección 3 presenta las pruebas y resultados de los métodos de autoenfoco para la adquisición de imagen; y la última sección se presenta la conclusión.

XXIII. PARTE TÉCNICA DEL ARTÍCULO

En esta sección se describe el trabajo realizado mediante la metodología propuesta: diseño y fabricación del cople para el microscopio y servomotor utilizando NX; algoritmos de AF propuestos *Global Search*-Varianza y *Hill Climb Search*-Varianza.

A. Diseño y fabricación

La Figura 2 muestra el acoplador diseñado en el software Siemens NX, en este estudio se propone maquinar la pieza en nylon por la facilidad de maquinado y resistencia a la torsión, el código G de maquinado fue tomado del mismo software arriba mencionado, en la Figura 3 se puede ver el diseño de la pieza y el montaje de la misma en el microscopio así como la unión con el servomotor, se realizaron las pruebas correspondientes y el resultado se puede ver en la Figura 4, el microscopio ya armado con el servomotor.

¹Instituto Tecnológico Superior de Lerdo. Av. Tecnológico N° 1555, Periférico Lerdo Km. 14.5, Placido Domingo, 35150 Cd Lerdo, Durango, México. * jtello@itslerdo.edu.mx.

B. Sistema de intercomunicación

La Figura 5 muestra el sistema para adquirir y posicionar el servo con Arduino. La intercomunicación se lleva a cabo de la siguiente manera: la computadora se comunica al Arduino; el Arduino le manda una señal al servomotor; el Servomotor mueve la lente del microscopio; la cámara obtiene una imagen; la cámara que está conectada a computadora, esta analizará la imagen; analizada la imagen se repite el proceso hasta obtener una mejor imagen, o sea una Nueva Varianza que sería su valor máximo de esta.

C. Función de enfoque

Las medidas de enfoque o funciones reportadas en el estado del arte incluyen diferenciación de imagen, profundidad de picos y valles, contraste de la imagen (enfoques estadísticos), basado en el histograma y las medidas de correlación, como se explica en [2, 7, 8]. De acuerdo con el dominio, las medidas de enfoque también se pueden dividir en medidas espaciales y de frecuencia. Las medidas espaciales incluyen operador Laplaciano, operador de Sobel, y enfoques estadísticos, que pueden determinar la nitidez con respecto a la información de borde o magnitud del gradiente de la imagen. Y las del dominio en la frecuencia, se puede incluir la Transformada Rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés), la DCT, o la Transformada Discreta Wavelet (DWT, por sus siglas en inglés), que pueden determinar la nitidez mediante la evaluación de los componentes de alta frecuencia de la imagen [9].

En este trabajo se propone analizar el comportamiento de la mejor y las más referenciada medida o función de enfoque en el dominio espacial, la varianza. Que cumple con las propiedades deseables de las funciones de enfoque: el valor máximo corresponde a la mejor posición de enfoque, a ambas no les afecta casi ningún máximo local y ruido, y son bastante robustas ante la variación de la textura en el objeto de análisis [10].

La Varianza (2) es una función estadística básica que evalúa la varianza de la luminancia en la imagen con respecto a su valor medio (1). En [11] se evaluaron 11 funciones que se centran en el análisis de una cuadrícula en un microscopio electrónico, evalúan las 11 funciones en base a la anchura del pico y el valor máximo y NV logra los mejores resultados. En [7] realizan una comparación de 13 funciones de enfoque diferentes para evaluar la nitidez o el contraste, se encontró que la auto-correlación y NV fueron medidas de enfoque óptimas para aplicaciones de microscopía de fluorescencia.

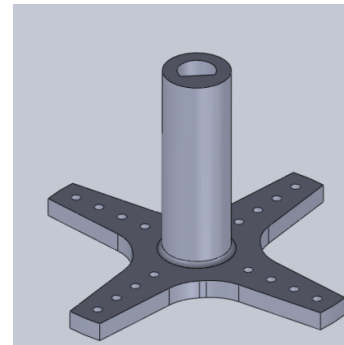


Figura 2 Pieza propuesta

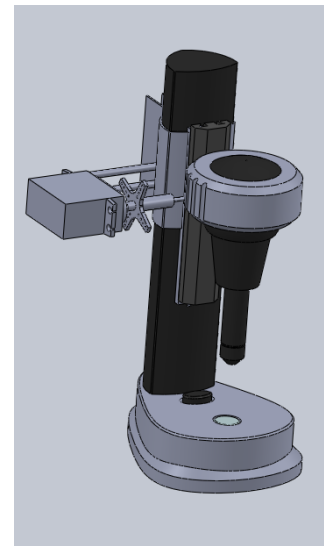


Figura 3 Montaje de pieza



Figura 4. Microscopio.

$$\mu = \frac{1}{HW} \sum_{x=1}^H \sum_{y=1}^W (i(x,y)) \quad (1)$$

$$NV = \frac{1}{HW\mu} \sum_{x=1}^H \sum_{y=1}^W (i(x,y) - \mu)^2 \quad (2)$$

En [2] comparan 16 medidas de enfoque que se centran en enfocar una imagen de 10 frotis de muestras de sangre y muestras de Papanicolaou (que está cerca de nuestro dominio de aplicación), concluyendo que la varianza de imagen posee el mejor rendimiento general y sugiriendo que la Varianza normalizada sería la medida de enfoque óptimo para todas las aplicaciones de microscopía. En la misma dirección, [12] informa que de un estudio exhaustivo comparando 18 medidas de enfoque, la Varianza normalizada proporciona el mejor rendimiento global, y [13] llegó a la conclusión que la varianza presentó un mejor poder de discriminación y un mayor rango de posibles valores, siendo una magnitud o medida más interesante para la determinación de enfoque.

D. Algoritmos de enfoque

Ahora se discutirá sobre los dos algoritmos de auto-enfoque BSA, en base al funcionamiento de la función de enfoque con respecto a la posición de la lente. Básicamente los algoritmos BSA se pueden dividir en los de búsqueda global y los algoritmos de cadenas numéricas. Todos ellos asumen de alguna manera que a pesar de que la medida enfoque óptimo en el enfoque automático (tipo pasivo) que los algoritmos BSA dependen no sólo de las características de la cámara, sino también del objeto de la imagen que se está analizando [19], en general, un máximo de la función de enfoque se produce en la posición central de la lente (Z0) discutido en [20].

Búsqueda Global (GS): Este es el algoritmo BSA más intuitivo. El algoritmo GS primero mueve la lente hasta una posición límite predeterminada, que otorga una imagen borrosa, a continuación, la lente se mueven en el eje Z por el servomotor hasta el otro extremo, mientras que la función de enfoque se calcula para cada paso o posición. Finalmente, la lente vuelve a la posición para la cual la función de enfoque se corresponde con el nivel óptimo de enfoque, es decir, a su máximo. La principal ventaja es que no hay posibilidad de obtener falsamente un máximo local, ya que todas las posiciones de enfoque se examinan [21].

En la Figura 6 se observa el funcionamiento del método implementado: en el primer paso verifica que la cámara se

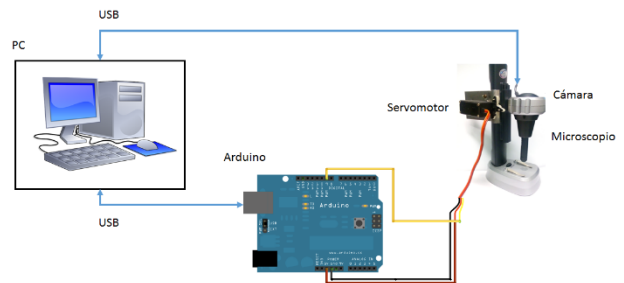


Figura 5. Sistema de intercomunicación.

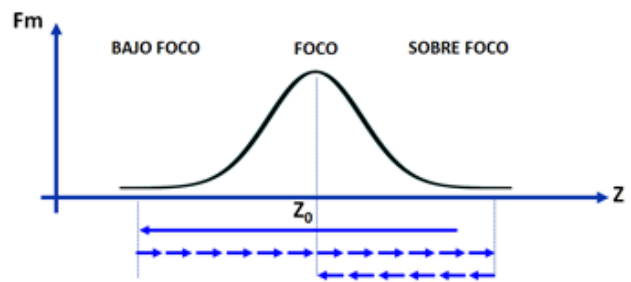


Figura 5. GS-V.

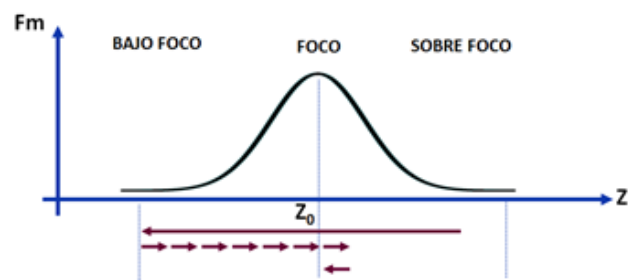


Figura 6. HCS-V.

encuentre encendida, de no estarlo envía un mensaje para que se encienda; el segundo paso para este método fue posicionar el servo a 50 grados, medir la función de enfoque mediante la varianza NV, y graficar, además de tomar el valor de NV como medida inicial del valor máximo; el siguiente paso es que entra a un ciclo for para mover el servo de la posición 70 grados a 110 grados; en cada paso o iteración se moverá el servo, se obtendrá el valor de NV, y se graficará, además se realizará una comparación entre el valor actual de la varianza NV y el valor anterior máximo NVmax; si este nuevo valor de NV es mayor que el anterior valor NVmax toma el valor de la varianza; una vez terminado este ciclo for el siguiente paso es regresar a buscar la imagen mejor enfocada utilizando otro ciclo for para encontrar nuevamente el valor máximo NVmax.

Las desventajas son que el tiempo de búsqueda es demasiado largo y, más crítica, que el enfoque habitual para asignar valores de la función de enfoque con la

posición de la lente y, finalmente, se mueve la lente a la posición de la máxima función de enfoque que conduce a imprecisiones, como la posición almacenada podría no corresponder a la mejor imagen enfocada, debido al efecto de la vibración en configuraciones de alta magnificación de rango medio.

Búsqueda del Pico de Mas Alto (HCS): Se desarrolló para la búsqueda rápida, se puede encontrar como HCS [10], Búsqueda del Pico (PS, por sus siglas en inglés) [17] o Búsqueda del Escalón Subida (MCS, por sus siglas en inglés) [23], Búsqueda Modificada del Pico de Subida Rápido (CS, por sus siglas en inglés) [24]. Similar a GS, primero mueve la lente hasta el límite de una posición predeterminada, y a continuación se inicia la búsqueda y la evaluación de la función de enfoque, suponiendo que esta función es creciente, y tan pronto como la función disminuye, se detiene la búsqueda y vuelve a la posición del máximo valor de la función de enfoque.

En la Figura 7 se observa el funcionamiento del método HCS implementado: en el primer paso verifica que la cámara se encuentre encendida, de no estarlo envía un mensaje para que se encienda; el segundo paso para este método fue posicionar el servo a 50 grados, medir la función de enfoque mediante la varianza NV, y graficar, además de tomar el valor de NV como medida inicial del valor máximo; el siguiente paso es que entra a un ciclo for para mover el servo de la posición 70 grados a 110 grados; en cada paso o iteración se moverá el servo, se obtendrá el valor de NV, y se graficará, además se realizará una comparación entre el valor actual de la varianza NV y el valor anterior máximo NVmax; a diferencia del método GS aquí se hace un análisis de la curva mediante la diferencia entre la varianza actual y el valor máximo de la varianza anterior ($DIFF = NV - NV_{max}$), esta diferencia sirve para saber cuándo la curva empieza a decaer; si este valor DIFF es menor que 10 entonces se rompe el ciclo for y empieza el nuevo ciclo; siendo el siguiente paso regresar a buscar la imagen mejor enfocada utilizando otro ciclo for para encontrar nuevamente el valor máximo NVmax.

El inconveniente, como se esperaba, es que la forma de la función podría no ser la media máxima debido al *backlash*.

XXIV. RESULTADOS

El experimento realizado consiste en la prueba de los 2 métodos de AF, para una muestra de portaobjetos de Coprinus mushroom set c.s.

Los resultados para cada operación de enfoque y método incluyen la imagen final enfocada, que es generalmente diferente para cada método, la evolución de la posición del eje Z en la lente y el valor de la función de

enfoque cuando el servomotor mueve la lente.

La Figura 6 y Figura 7 ilustran la evolución para cada uno de los métodos específicos de enfoque analizados mediante la Interfaz gráfica desarrollada, que son 2 métodos de enfoques consecutivos en el eje Z: para cada paso del servomotor la primera fila muestra la posición de la lente de Z; la segunda fila de gráficas es utilizando la Varianza como función de enfoque, estas muestras el valor de la función de enfoque (FF Value) a lo largo del autoenfoco. Con el fin de comparar de manera justa, anterior a cada operación de enfoque, la lente es posicionada en una posición fija mediante el servo (POS=50).

La Tabla 1 incluye los resultados cuantitativos para las 10 operaciones obteniendo las 20 imágenes enfocadas.

Con el fin de evaluar la calidad final de la imagen enfocada se evalúa su valor medio (STD_{μ}) y la desviación (STD_{σ}). También se muestra la longitud de la trayectoria recorrida por la lente (ΔZ) para cada método, y el valor de la función de enfoque de la imagen enfocada finalmente adquirida.

Los datos del cuadro indican: que el algoritmo de GS obtiene los resultados más precisos y estables (véanse las dos primeras columnas); que la medida NV funciona bien para obtener imágenes con un contraste máximo; que el algoritmo HCS es más rápido, pero también el menos preciso.

TABLA 1
MEDIA DE LOS RESULTADOS POR CADA MÉTODO AF.

MÉTODO	Media del valor final de los resultados				
	STD_{μ}	STD_{σ}	NS	ΔZ	FF
GS-V	0.9141	0.1348	316.38	1261.52	0.8408
HCS-NV	0.8677	0.1721	131.4	521.6	0.6965

XXV. CONCLUSIÓN

En conclusión, se describe dos métodos de AF para capturar automáticamente las secuencias de imágenes enfocadas de microscopios. Los métodos utilizan la medida de enfoque con dos algoritmos de búsqueda que almacena la mejor imagen mejor enfocada ya que revisa el eje Z con velocidad constante y precisa gracias a la aplicación del servomotor, por lo tanto, logrando la preservación de los dispositivos mecánicos y evitando el efecto de la vibración en configuraciones de alta magnificación de rango medio, incluyendo como resultado la prevención del efecto de backlash en el eje Z ya que es el de mayor impacto para el uso posterior de las imágenes adquiridas.

XXVI. REFERENCIAS

- [52] Redhead SA, Vilgalys R, Moncalvo J-M, Johnson J & Hopple, JS Jr. *Coprinus Pers. and the disposition of Coprinus species sensu lato*. *Taxon* 50(1): 203-241. 2001.
- [53] Liu, X. Y., Wang, W. H., & Sun, Y. (2006, August). Autofocusing for automated microscopic evaluation of blood smear and pap smear. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS'06. 28th Annual International Conference of the IEEE* (pp. 4718-4721). IEEE.
- [54] Geusebroek, J. M., Cornelissen, F., Smeulders, A. W., & Geerts, H. (2000). Robust autofocusing in microscopy. *Cytometry*, 39(1), 1-9.
- [55] Plissiti, M. E., Nikou, C., & Charchanti, A. (2011). Automated detection of cell nuclei in Pap smear images using morphological reconstruction and clustering. *Information Technology in Biomedicine, IEEE Transactions on*, 15(2), 233-241.
- [56] Luo, J., Sun, L., Wu, K., Chen, W., & Fu, L. (2010). Multi-parameter fusion algorithm for auto focus. *Chinese Optics Letters*, 8(6), 580-583.
- [57] Chang, C. H. (2005). *Auto Focus Using Adaptive Step Size Search and Zoom Tracking Algorithm*. Doctoral dissertation, Master Thesis, Department of Computer Science and Information Engineering, National Taiwan University.
- [58] Santos, A., Ortiz de Solorzano, C., Vaquero, J. J., Pena, J. M., Malpica, N., & Del Pozo, F. (1997). Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis. *Journal of Microscopy*, 188(3), 264-272.
- [59] Liu, X. Y., Wang, W. H., & Sun, Y. (2007). Dynamic evaluation of autofocusing for automated microscopic analysis of blood smear and pap smear. *Journal of microscopy*, 227(1), 15-23.
- [60] Chen, C. Y., Hwang, R. C., & Chen, Y. J. (2010). A passive auto-focus camera control system. *Applied Soft Computing*, 10(1), 296-303.
- [61] Choi, K. S., Lee, J. S., & Ko, S. J. (1999). New autofocusing technique using the frequency selective weighted median filter for video cameras. *Consumer Electronics, IEEE Transactions on*, 45(3), 820-827.
- [62] Groen, F. C., Young, I. T., & Lighthart, G. (1985). A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms. *Cytometry*, 6(2), 81-91.
- [63] Sun, Y., Duthaler, S., & Nelson, B. J. (2005, August). Autofocusing algorithm selection in computer microscopy. In *Intelligent Robots and Systems, 2005. (IROS 2005). 2005 IEEE/RSJ International Conference on* (pp. 70-76). IEEE.
- [64] [13] Fernández, P. R., Lázaro, J. L., Gardel, A., Cano, Á. E., & Bravo, I. (2009). A Focusing Method in the Calibration Process of Image Sensors Based on IOFBs. *Sensors*, 10(1), 47-60.
- [65] Baina, J., & Dublet, J. (1995, July). Automatic focus and iris control for video cameras. In *Image Processing and its Applications, 1995., Fifth International Conference on* (pp. 232-235). IET.
- [66] Char, M., Nyeck, A., & Tossier, A. (1991). Focusing criterion. *Electronics Letters*, 27(14), 1233-1235.
- [67] Lee, S. Y., Park, S. S., Kim, C. S., Kumar, Y., & Kim, S. W. (2006, January). Low-power auto focus algorithm using modified DCT for the mobile phones. In *Consumer Electronics, 2006. ICCE'06. 2006 Digest of Technical Papers. International Conference on* (pp. 67-68). IEEE.
- [68] Xu, X., Wang, Y., Tang, J., Zhang, X. & Liu, X. (2011). Robust automatic focus algorithm for low contrast images using a new contrast measure. *Sensors*, 11(9), 8281- 8294.
- [69] Zhao, Q., Luo, X., Zhou, N., & Wu, J. (2012). Multiple and color images compression-encryption schemes with balanced qualities based on the multiple-order discrete fractional cosine transform. *Chinese Optics Letters*, 10(s1), 11006.
- [70] Subbarao, M., & Tyan, J. K. (1998). Selecting the optimal focus measure for autofocusing and depth-from-focus. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 20(8), 864-870.
- [71] Lin, K. C. (2010). Microscopic autofocusing using regional monotonous variations of multiple focal value measures. *Journal of Electronic Imaging*, 19(2), 023012- 023012.
- [72] Russell, M. J., Bester, A. & Douglas, T. S. (2005). Autofocusing a smart microscope for the detection of tuberculosis in sputum smears. *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium of the Pattern Recognition Association of South Africa*, 183-191.
- [73] Kehtarnavaz, N., & Oh, H. J. (2003). Development and real-time implementation of a rule-based auto-focus algorithm. *Real-Time Imaging*, 9(3), 197-203.
- [74] Ooi, K., Izumi, K., Nozaki, M., & Takeda, I. (1990). An advanced autofocus system for video camera using quasi condition reasoning. *Consumer Electronics, IEEE Transactions on*, 36(3), 526-530.
- [75] He, J., Zhou, R., & Hong, Z. (2003). Modified fast climbing search auto-focus algorithm with adaptive step size searching technique for digital camera. *Consumer Electronics, IEEE Transactions on*, 49(2), 257-262.

XXVII. BIOGRAFÍA

Pablo Reyes. Es alumno de octavo semestre de la carrera de Ingeniería Industrial del Instituto Tecnológico Superior de Lerdo, Lerdo, México. Actualmente se encuentra realizando su residencia profesional como diseñador industrial para la empresa Industrias de Linamar S.A. de C.V., Gómez Palacio, Durango, México. Su interés está en el diseño industrial y la manufactura avanzada.

Héctor Quiariarte. Estudió en la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica desde septiembre de 1985 hasta junio de 1990, obtuvo el grado en Ingeniería Eléctrica y Mecánica en abril de 1992. Actualmente cursa la especialización Mecatrónica en el Instituto Tecnológico Superior de Lerdo. Participo en el desarrollo de proyectos de fuente de alimentación y de una impulsión de la velocidad de la corriente directa para motores de la corriente directa. Actualmente es profesor de inglés en la escuela primaria Ricardo Flores Magón.

Santiago Tello-Mijares. Recibió el título de Ingeniero en Electrónica en 2006, y el de Doctor en Ciencias Eléctricas en 2013, por parte del Instituto Tecnológico de la Laguna, México; y en 2017 recibió el título de Doctor en Ingeniería Informática y de Telecomunicación por parte de la Universidad Autónoma de Madrid, España, obteniendo Mención Cum Laude. En la actualidad es Profesor Titular A e Investigador Científico del Departamento de Postgrado de Mecatrónica del Instituto Tecnológico Superior de Lerdo, México. Es candidato al SIN por parte del CONACYT. Sus intereses de investigación son el procesamiento de imágenes biomédicas y la inteligencia artificial.

Jesús Linares. Recibió su grado de Ingeniero Industrial en Producción del IITL, Torreón Coahuila, México. Actualmente trabaja en la obtención del grado de la maestría en ciencias de Ingeniería Industrial del IITL. Tiene el puesto de profesor investigador titular A del departamento de Ingeniería Industrial en el ITSL, Lerdo Durango, México. Ha sido asesor de titulación desde 2002 a la fecha y coordinador interno CACEI. Su interés está en la Manufactura avanzada.