

# Estudio y aplicación de registro de imágenes panorámicas en microscopía óptica

Santiago A. Fiotto

Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Entre Ríos, Argentina  
[santiago.a.fiotto@gmail.com](mailto:santiago.a.fiotto@gmail.com)  
Cursante de Grado - Trabajo de Investigación en Imágenes - Carrera: Bioingeniería

Docente Investigador: Dr. Javier E. Diaz Zamboni  
[jdiaz@ingenieria.uner.edu.ar](mailto:jdiaz@ingenieria.uner.edu.ar)

**Resumen.** En la microscopía óptica convencional es común que el analista necesite construir una imagen de alta resolución a partir de imágenes de menor resolución. Para realizar esto, usualmente, realiza una serie de capturas y luego recurre a software de edición o procesamiento de imágenes para unir las, como en un rompecabezas, y así generar una imagen de mayor resolución. Esto resulta en una tarea tediosa y que insume gran cantidad de tiempo. En virtud de esta problemática, en este trabajo se estudia una forma de adquisición de imágenes panorámicas para microscopía óptica. Esta se basa en la adquisición continua de una imagen panorámica mientras se escanea la muestra moviendo la platina del microscopio. Este movimiento es simplemente una traslación de la muestra, siendo esta una situación que simplifica el problema general de encontrar las transformaciones que existen entre imágenes que poseen regiones superpuestas. La solución propuesta en este trabajo consiste en un algoritmo para construir una imagen panorámica, utilizando herramientas de visión computacional de la biblioteca OpenCV. Las pruebas iniciales realizadas al algoritmo, muestran resultados prometedores en relación a la velocidad y calidad de la imagen panorámica.

**Palabras clave:** microscopía óptica, imagen panorámica, OpenCV.

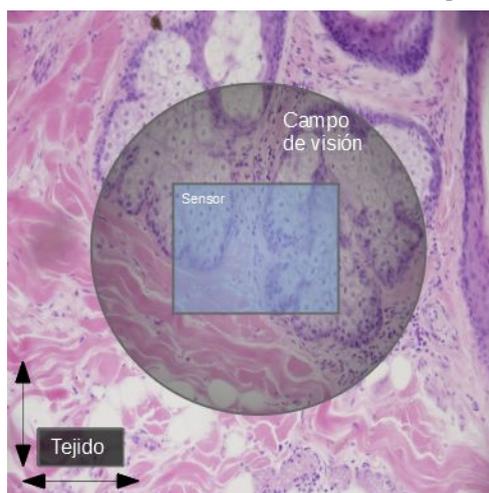
## 1 Introducción

En la microscopía óptica convencional es común que el microscopista deba observar muestras grandes en relación al campo de visión del instrumento. De esta manera, el analista se ve en la tarea de estudiar en detalle todo el material (por ejemplo, biopsias de tejidos), relacionando las diferentes estructuras y patrones que observa, para establecer, por ejemplo, qué porción del tejido es normal y cuál patológico. Este

estudio minucioso de los detalles en grandes extensiones de tejido, hace que el microscopista deba alternar entre las diferentes magnificaciones que tiene el microscopio, para relacionar las estructuras a diferentes escalas.

En la práctica, el registro digital de estas imágenes consiste en seleccionar determinadas regiones de la muestra y capturar un conjunto de imágenes para documentación y generación de informes. Cuando el microscopista necesita construir una imagen de mayor resolución a partir de imágenes de menor resolución, recurre a software de edición o de procesamiento de imágenes, para generarla. En algunos pocos casos, el software del sistema de registro de imágenes del microscopio ofrece esta funcionalidad con cierto nivel de automatismo, pero, en general, es una tarea que se hace manualmente. Así, el analista que estudia una muestra en el microscopio, recorre la misma casi en su totalidad en busca de estructuras y patrones. De acuerdo al tipo de análisis que realice puede utilizar distintos aumentos y registrar imágenes en cada uno de ellos. Desde un punto de vista operacional, para un aumento dado, esto involucra ajustes del foco con los tornillos macro y micrométrico, y desplazamiento de la muestra tratando de cubrir toda su extensión.

Cuando el microscopista analiza la muestra, desde el microscopio observa visualmente a través de los oculares lo que está contenido en el campo de visión. Si realiza capturas digitales obtiene un sector acotado del campo de visión, ya que generalmente, las dimensiones del sensor es menor que la del campo de visión. En la Fig. 1 se esquematiza la relación de las áreas para una magnificación dada. En un microscopio óptico, en general, se desplaza la muestra y el campo de visión y dispositivo de captura están fijos al estativo del microscopio. Como se puede observar en la Fig. 1, en general, la superficie de la muestra es extensamente mayor al campo de visión, y el tamaño del sensor es menor en relación al campo de visión.



**Fig. 1.** Esquema de la relación entre el área del espécimen, el campo de visión del microscopio y el sensor del dispositivo de captura.

El hecho de que el sensor tenga dimensiones menores al campo de visión tiene su fundamento en la teoría de formación y adquisición de imágenes ópticas. La selección del sensor para el registro de imágenes en microscopía debe seguir una serie de criterios para garantizar un muestreo adecuado de la señal de interés. Para microscopía óptica convencional, el tamaño de los píxeles del sensor de la cámara se selecciona en conjunto con los parámetros de las ópticas (magnificación, apertura numérica, etc.) de forma tal que se cumpla con el criterio del muestreo de Nyquist. Por su parte, los sensores no pueden ser extremadamente grandes (en número de píxeles), porque esto tiene actualmente limitantes relacionadas con la velocidad de captura, y por supuesto otros como los costos. Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 1, en general el sensor cubre una superficie menor al campo de visión, donde está garantizada cierta homogeneidad de iluminación y se evitan aberraciones ópticas que comúnmente se observan en la frontera límite del campo de visión.

Estas condiciones de captura, hacen que sea imposible obtener simultáneamente alta resolución óptica y una amplia superficie cubierta. Sin embargo, es posible construir una imagen a partir de la captura de imágenes de menor resolución. Esto se puede lograr utilizando la técnica para capturar o construir imágenes panorámicas (o *stitching*, en inglés), que ya ha sido desarrollada y adaptada en una amplia variedad de aplicaciones, entre las que se pueden mencionar, someramente, generación de imágenes satelitales a diferentes escalas, adquisición de imágenes astronómicas, aplicaciones para obtención de imágenes panorámicas de usuarios finales en dispositivos inteligentes, adquisición de imágenes médicas, entre otras.

El *stitching* es una técnica que permite construir una imagen de alta resolución a partir de la unión de múltiples imágenes de menor resolución con regiones superpuestas[1]. Si bien el *stitching* está ampliamente desarrollado en varias aplicaciones, en microscopía aún no se ha impuesto como una técnica de adquisición de imágenes por escaneo. De hecho, como se mencionó anteriormente, es poco común encontrarse con esta funcionalidad en el software que acompaña los microscopios, y generalmente es algo que se resuelve manualmente con software de edición o procesamiento de imágenes. Sin embargo, la tecnología para aplicarla a microscopía óptica se encuentra disponible, resultando ideal para realizar un registro panorámico de imágenes en microscopía. De hecho, en el área de investigación y desarrollo se ha estudiado la aplicación de la técnica en microscopía confocal para la formación de una única imagen 3D [2], y también en algunos primeros trabajos en microscopía virtual [3], entre otras aplicaciones específicas por ejemplo como Autostitch [10], MIST [11] (del inglés, *Microscopy Image Stitching Tool*) disponibles para software ImageJ. En particular, nuestro análisis nos condujo a la biblioteca OpenCV orientada principalmente a la visión computacional en tiempo real [12]. Esta biblioteca posee una clase *Stitcher* que permite generar imágenes panorámicas.

La técnica de *stitching* puede ser directa. Dado un conjunto de imágenes, o mosaicos, se utiliza toda la información para conformar la imagen de alta resolución. Esta metodología ha mostrado ser muy precisa, pero requiere de una inicialización, presentando las imágenes en un orden aproximado o fijo para unir las [4, 5]. Otra forma de realizar *stitching*, se basa en la extracción de características de las imágenes. Esto no requiere una inicialización y normalmente consta de las siguientes etapas [6]: extracción de características invariantes utilizando una transformación de características invariantes a la escala, o SIFT (del inglés: *Scale Invariant Feature Transform*) [7], o bien, por versiones mejoradas del mismo [8]; búsqueda de estructuras que se superponen en cada imagen y de estas las imágenes que tengan la mayor cantidad de características coincidentes. Para esto se utiliza el método iterativo RANSAC (del inglés: *Random Sample Consensus*) [9] que estima los parámetros de las transformaciones que existe en estas estructuras entre las imágenes. Se verifican probabilísticamente estas coincidencias y se encuentran las imágenes vinculadas por las mismas. Se realiza un ajuste para resolver las transformaciones (afines, de traslación, rotación en los diferentes planos, zoom e iluminación) entre las imágenes seleccionadas de mayor coincidencias y finalmente se efectúa el renderizado, obteniéndose una imagen panorámica.

El estudio breve presentado en este trabajo se enmarca, en el diseño y desarrollo de una herramienta que permita un registro (ágil) panorámico de imágenes de microscopía óptica. La idea es que mientras el microscopista barre la imagen observando por ocular o bien el monitor, pueda ir construyendo una imagen panorámica de alta resolución de la muestra. Realizamos una primera implementación con el *Stitcher* de OpenCV con buenos resultados en cuanto a calidad de imagen, pero al ir aumentando el número de imágenes que forman la panorámica, el tiempo de procesamiento se hace mayor. Viendo esta dificultad, se diseñó y desarrolló un nuevo algoritmo que permite obtener la imagen panorámica de una forma más simple y acotada a las transformaciones presentes en el proceso de escaneo. Este algoritmo mostró resultados cualitativos prometedores en relación a la velocidad de construcción de la imagen de alta resolución. Sin embargo, para estudiar la técnica de manera sistemática y objetiva respecto de la incidencia de principales factores en la formación de la imagen de alta resolución. En particular, en este trabajo se estudia la incidencia del tamaño de la máscara (una porción de la imagen) de búsqueda entre cada cuadro que llega desde el dispositivo, en relación al tiempo de procesamiento y la calidad resultante de la imagen analizada desde un punto de vista cualitativo.

## 2 Materiales y Métodos

Las pruebas realizadas en este trabajo se programaron en Python 3.7, en una computadora Lenovo G480, con core i3 de tercera generación. Para la búsqueda de regiones coincidentes entre dos imágenes, se utilizó la herramienta *Template Matching* de la biblioteca OpenCV 4.1.1. Esta herramienta es básicamente la función

*matchTemplate* que utiliza varios métodos de análisis, para obtener las posiciones de coincidencia de una (imagen) plantilla en una imagen. Para lograr esto, utiliza tres parámetros. La plantilla de búsqueda de dimensiones  $m \times n$ , la imagen donde se busca la plantilla de dimensiones  $M \times N$ , donde  $m < M$  y  $n < N$ ; y el tercer parámetro que es el método de análisis para realizar la búsqueda. En particular, en este trabajo utilizamos el coeficiente de correlación normalizado (TM\_CCOEFF\_NORMED), definido de la siguiente manera:

$$R(x, y) = \frac{\sum_{x', y'} T(x', y') * I(x+x', y+y')}{\sqrt{\sum_{x', y'} T(x', y')^2 * \sum_{x', y'} I(x+x', y+y')^2}}$$

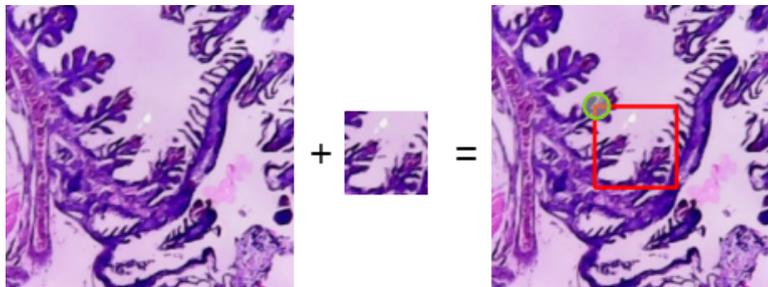
$$\text{siendo } T'(x', y') = T(x', y') - \frac{1}{(w * h)} * \sum_{x'', y''} T(x'', y'')$$

$$\text{y } I'(x+x', y+y') = I(x+x', y+y') - \frac{1}{(w * h)} * \sum_{x'', y''} I(x+x', y+y')$$

Donde  $I$  es la imagen de entrada,  $T$  es la máscara,  $R$  es imagen resultado,  $h$  y  $w$  el alto y ancho de la plantilla,  $y$  y  $x$  la posición de píxel en el eje vertical y horizontal respectivamente (de la imagen  $R$ ),  $x' = 0..w-1$ ,  $y' = 0..h-1$ .

El resultado que retorna esta función de búsqueda es una imagen de intensidades de dimensiones  $(W-w+1) \times (H-h+1)$ , de la cual se pueden extraer las coincidencias de la plantilla en la imagen, hallando los máximos en la misma. Esta última etapa puede realizarse utilizando la función *minMaxLoc*, también de OpenCV, la cual recibiendo como parámetro el resultado de la función *matchTemplate*, retorna mínimo, máximo y las localizaciones respecto de la imagen donde se realizó la búsqueda.

En la Fig. 2 se representa la búsqueda de la máscara en la imagen original. El objetivo es obtener la posición en la que se encontró la misma, para la cual en este trabajo la referencia es el píxel correspondiente a la esquina superior izquierda.



**Fig. 2.** Esquema de la relación entre la plantilla, la imagen y el resultado de la búsqueda (posición) de la plantilla en la imagen indicado en verde.

### Algoritmo propuesto

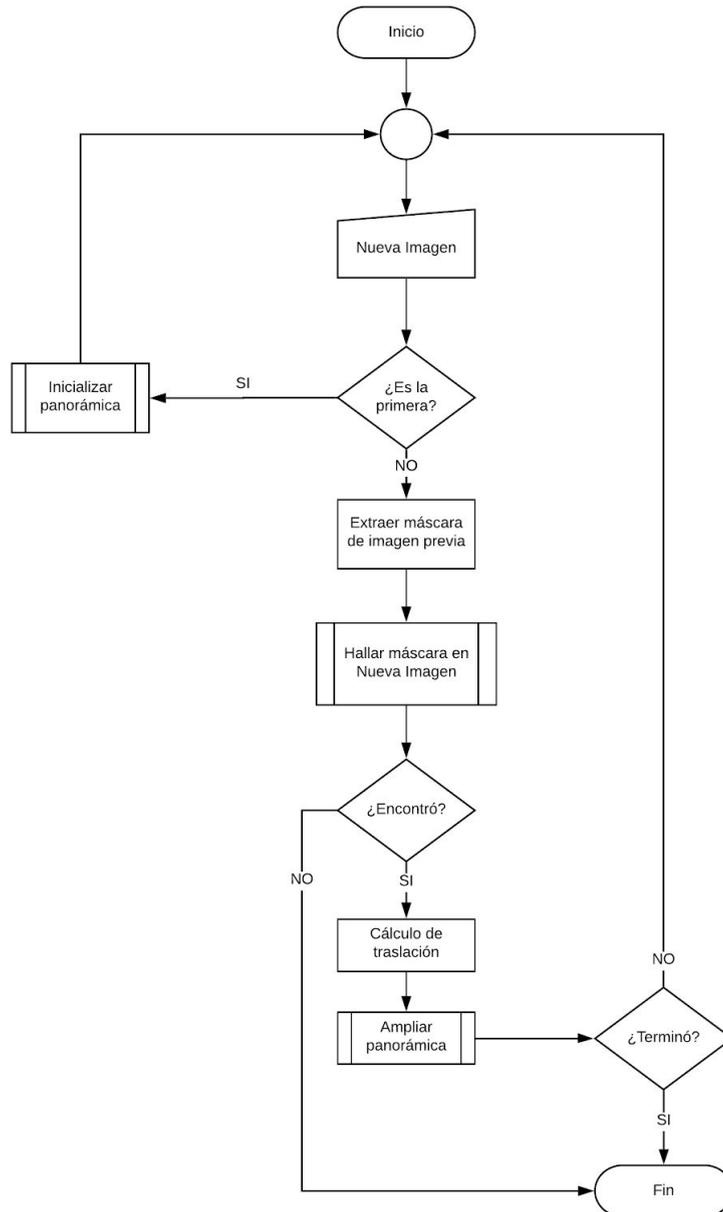
Los algoritmos para la estimación de las transformaciones afines entre imágenes superpuestas, en general calculan transformaciones de rotación, de traslación, escala y otras características como la iluminación. Sin embargo, la aplicación que se plantea en este trabajo es en microscopía óptica y el movimiento de la platina de un microscopio óptico se realiza en el plano que contiene la muestra con dos tornillos, uno desplaza la muestra en la dirección X y otro que la desplaza en la dirección Y. Por lo tanto, en el movimiento de la muestra en un microscopio solo tenemos transformaciones de traslación. En este sentido, el algoritmo propuesto en este trabajo realiza una estimación de las transformaciones de traslación que existe entre cada imagen que llega desde el dispositivo de captura. Esto simplifica el cómputo que se debe llevar a cabo para el *stitching*, ya que no se deben estimar otras transformaciones.

En la Fig. 3 se presenta un diagrama de flujo del algoritmo propuesto. La idea conceptual del mismo es que se va construyendo la panorámica a medida que llegan las imágenes del dispositivo de captura. Dado que en general, durante la captura, el tamaño de la imagen no se modifica, se asume que el tamaño de las imágenes es siempre el mismo. Así, la primera imagen en ingresar inicializa la panorámica con el tamaño que tiene la imagen. A continuación, a las siguientes imágenes que llegan desde la cámara se le aplica la lógica representada en el diagrama. Esto finaliza una vez que la captura se interrumpe.

En cada nueva imagen que ingresa se busca una máscara que ha sido extraída de la imagen previa. Si esta máscara se encuentra en la nueva imagen, se calcula la traslación que se debe realizar. Para hallar la máscara se utiliza *matchTemplate* y para hallar la posición de la misma se utiliza *minMaxLoc*. Con esto es posible calcular la posición donde se debe colocar la nueva imagen, luego de haber expandido la panorámica. En el siguiente paso, la nueva imagen pasa a ser la previa, y la tarea se repite mientras haya nuevas imágenes llegando desde el dispositivo de captura.

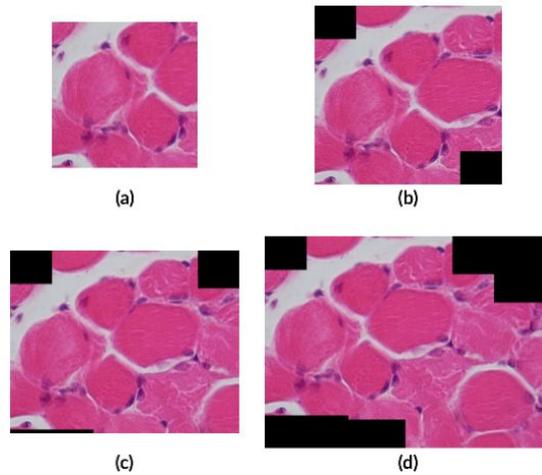
## 3 Resultados

Para corroborar el funcionamiento del algoritmo implementado se realizaron pruebas a partir de imágenes de alta resolución. Tomando una imagen de alta resolución se simuló una captura como la esperada en un microscopio, asumiendo un tamaño de sensor menor a las dimensiones de la imagen de alta resolución. Desplazando este sensor (región de captura) sobre la imagen de alta resolución, se pudo generar traslaciones conocidas en diferentes direcciones sobre la imagen de alta resolución. Lo que permitió verificar cualitativamente si el algoritmo propuesto genera una panorámica con o sin artefactos visibles.



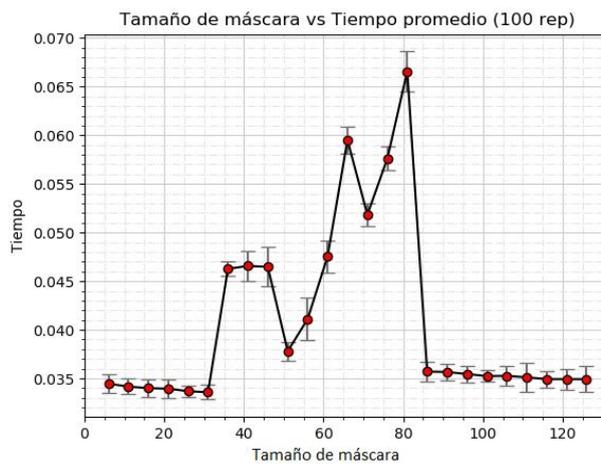
**Fig. 3.** Diagrama de flujo del algoritmo que genera una imagen panorámica a partir del ingreso secuencial de imágenes que se asumen trasladadas una respecto de otra.

En la Fig. 4 puede observarse cómo el algoritmo implementado genera la imagen panorámica a partir de 4 imágenes de 1024x1024 dando como resultado una imagen de mayor resolución (Fig. 4-d).



**Fig. 4.** *Stitching* de imágenes de preparado de hematoxilina eosina de músculo esquelético estriado transversal. (a) Imagen de 1024x1024. (b) Imagen de 1317x1257. (c) Imagen de 1608x1287. (d) Imagen de 2008x1487.

También se realizaron pruebas para conocer el tiempo que le lleva al algoritmo propuesto conformar una imagen panorámica, en función del tamaño de la máscara a utilizar. El propósito de esta prueba es establecer la incidencia en el tiempo debido al tamaño de la máscara. Esta evaluación consistió en determinar el tiempo promedio (y sus desviaciones estándar) que destina el algoritmo propuesto en generar una imagen panorámica a partir de la unión de dos imágenes. Se varió el tamaño de la máscara desde 6x6 hasta 130x130 incrementándola de a pasos de cinco píxeles en cada dirección. La promediación se realizó sobre 100 repeticiones de la medidas de tiempo tomadas para cada tamaño de máscara (ver Fig. 5).



**Fig. 5:** Tiempos promedio y desviaciones estándar en la generación de una imagen panorámica variando el tamaño de la máscara.

## 4 Conclusión

En el presente trabajo se estudió la formación de imágenes panorámicas en microscopía óptica, a partir del escaneo manual de la muestra, utilizado como técnica para construir una imagen de alta resolución a partir de imágenes de menor resolución. Planteado el problema, se propuso un algoritmo que genera la imagen panorámica, considerando sólo las transformaciones de traslación que hay entre una imagen y la siguiente en el escenario de captura de imágenes con un microscopio óptico convencional.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas, se observó cualitativamente que las imágenes panorámicas resultan prácticamente iguales. También se constató que el tamaño de la máscara que se utiliza para hallar la posición de la misma en la nueva imagen, tiene mayor incidencia en la calidad y el tiempo de unión de imágenes frente a otros procesos. Esto es, por ejemplo, si la máscara es muy pequeña, el algoritmo puede considerar zonas de coincidencia erróneas, derivando en un mal cálculo de la traslación entre las imágenes, y así una unión incorrecta. Por otro lado, si la máscara es demasiado grande, se genera un error a la hora de utilizar el método de matcheo de correlación normalizada, por lo que directamente no puede hallarse la transformación de traslación.

## 5 Trabajos futuros

La propuesta de técnica de adquisición de imagen panorámica de este trabajo está en sus inicios de desarrollo y prueba. Por lo tanto, han quedado fuera del alcance de este breve artículo varios aspectos del proyecto que son convenientes rescatar. Uno tiene que ver con la profundización del estudio de la incidencia de la máscara de búsqueda, principalmente, por su impacto en la eficacia a la hora de hallar las coincidencias entre dos imágenes. Se pretende lograr que el algoritmo propuesto sea capaz de encontrar correctamente los puntos de coincidencia entre dos imágenes de cualquier tipo de preparado o cualquier zona de una misma muestra, lo que podría lograrse haciéndolo más independiente del grado de solapamiento entre imágenes. Por ejemplo, teniendo en cuenta más de una región para extraer la máscara para estimar la traslación. Sin embargo, esto lleva impuesto la restricción del número de máscaras posibles, ya que la búsqueda de máscara tiene una importante incidencia en el tiempo en el que realiza la tarea, el cual debería ser el menor posible, para lograr una captura de la panorámica que sea fluida para el usuario.

En una etapa posterior, se harán pruebas en microscopios. Se pretende evaluar la calidad de imagen panorámica generada, considerando otros problemas que pueden aparecer en el proceso de la captura real, como el *blurring* por movimiento, el desenfoque de la lente objetiva, entre otros. Para cuantificar el grado de distorsión que se debe a esta forma de adquisición se ha considerado utilizar el método de similitud

estructura [13], o SSIM (del inglés: *Structural SIMilarity*), en las regiones de coincidencia entre cuadros consecutivos.

Finalmente, se quiere mencionar que se espera generar una aplicación final que permita a usuarios realizar la adquisición de imágenes panorámicas en microscopía óptica, siendo informado durante la captura todos los aspectos de la calidad de la imagen, como el grado de desenfoque, SSIM entre regiones de imágenes coincidentes, entre otras características.

## 6 References

1. Zomet A., Levin A., Peleg S. y Weiss Y.: Seamless Image Stitching by Minimizing False Edges. *IEEE Transactions on image processing*, vol. 15, nº 4, pp. 969-977. (Abril 2006).
2. Preibisch S., Saalfeld S. y Tomancak P.: Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *BIOINFORMATICS*, vol. 25, nº 11, pp. 1463-1465. (2009).
3. Afeworkt A. y col.: Digital Dynamic Telepathology - the Virtual Microscope. AMIA, inc., pp. 912-916. (1998).
4. Sawhney H. S. y Kumar R.: True Multi-Image Alignment and Its Application to Mosaicing and Lens Distortion Correction. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*. vol. 21, nº 3, pp. 235-243 (Marzo 1999).
5. Shum, H.-Y. y Szeliski R.: Construction of Panoramic Image Mosaics with Global and Local Alignment. *Evolution Programs*. 3rd edn. Springer Science, pp. 227-268 New York (2001).
6. Brown M. y Lowe D. G.: Automatic Panoramic Image Stitching using Invariant Features. *International Journal of Computer Vision* 74(1). pp. 59-73. Springer Science, Estados Unidos (2007).
7. Lowe D. G.: Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *International Journal of Computer Vision* 60(2). pp. 91-110. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos (2004).
8. Yang F., Deng Z.-S., y Fan Q.-H.: A method for fast automated microscope image stitching. *Micron* 48, pp 17-25. Elsevier Ltd. (2013).
9. Fischler M. A. y Bolles R. C.: Random Sample Consensus: A Paradigm for Model Fitting with Applications to Image Analysis and Automated Cartography. *Communications of the ACM* vol.24, nº 6, pp. 381-395. (Junio 1981).
10. Ma B. y col.: Use of Autostitch for automatic stitching of microscope images. *Micron* 38, pp 492-499. Elsevier Ltd. (2007).
11. Chalfoun J. y col.: MIST: Accurate and Scalable Microscopy Image Stitching Tool with Stage Modeling and Error Minimization. *Scientific Reports* pp. 1-10. Nature (Julio 2017).
12. Pulli K., Baksheev A., Korniyakov K., Eruhimo V.: Real-Time Computer Vision with OpenCV. *Communications of the ACM* vol. 55, nº 6, pp. 61-69. (Junio 2012).
13. Wang Z., Bovik A. C., Sheikh H. R. y Simoncelli E. P.: The SSIM Index for Image Quality Assessment Zhou Wang's Homepage, <https://www.cns.nyu.edu/~lcv/ssim/>, último acceso Febrero 2011.