



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 59 780 B4 2007.02.15**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **103 59 780.8**
 (22) Anmeldetag: **19.12.2003**
 (43) Offenlegungstag: **01.09.2005**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **15.02.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G02B 21/24 (2006.01)**
G02B 7/36 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
PENTACON GmbH Foto- und Feinwerktechnik,
01277 Dresden, DE

(74) Vertreter:
Riechelmann & Carlsohn, 01219 Dresden

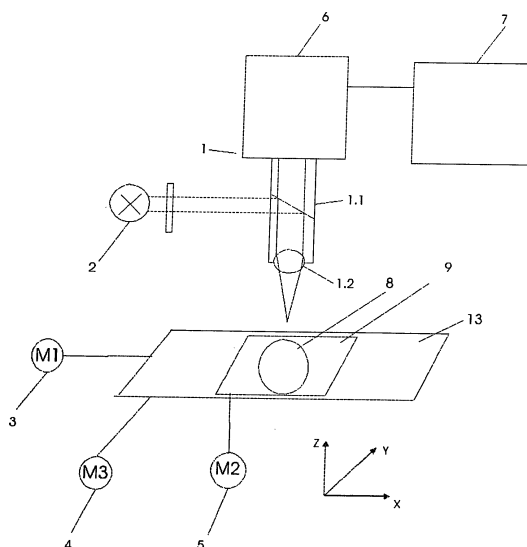
(72) Erfinder:
Jehmlich, Hans, Dr., 01454 Radeberg, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
DE 199 22 341 C2
DE 196 53 413 C2
DE 195 02 472 A1
US 64 49 087 B2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur optischen Bilderfassung**

(57) Hauptanspruch: Optisches Bilderzeugungsverfahren, umfassend die Schritte

- Festlegen von mindestens 3 Meßpunkten (x_i, y_i) auf dem Aufnahmeobjekt;
- Ermitteln der zugehörigen Schärfeebenen (z_k) für jeden dieser Meßpunkte;
- Erzeugung eines Höhenprofils aus den ermittelten Schärfeebenen (z_k) für zumindest einen Bereich des Aufnahmeobjektes durch Interpolation und/oder Extrapolation;
- Aufnahmen von Teilbildern in den interpolierten und/oder extrapolierten Bereichen des Höhenprofils, wobei für jedes Teilbild dessen Schärfeebene (z_k) aus dem Höhenprofil bestimmt wird;
- Zusammensetzen des zu erzeugenden Bildes aus den aufgenommenen Teilbildern.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erzeugen eines Bildes eines Objektes mittels eines optischen Systems, wobei das Bild aus mehreren Teilbildern zusammengesetzt ist.

[0002] Ein derartiges Verfahren kann insbesondere zur Untersuchung von biologischen Proben angewendet werden. Solche biologischen Proben werden z. B. durch Markierung von Kontaminationen mit fluoreszierenden Substanzen und anschließenden Trennen der Flüssigkeit von den Kontaminationen durch Filtern erzeugt. Die Filter sind die Träger der markierten Kontaminationen. Ziel einer solchen Untersuchung ist es in vielen Fällen festzustellen, ob eine Kontamination vorliegt, beispielsweise eine mikrobiologische Kontamination mit Bakterien wie *E. coli*.

[0003] Bei der Untersuchung von extrem gering oder nicht kontaminierten Proben bestehen besondere Schwierigkeiten. Ein Problem ist insbesondere die Schwierigkeit, das optische System, beispielsweise ein Licht- oder Fluoreszenzlichtmikroskop auf die Probe zu fokussieren. Dies ist insbesondere deshalb schwierig, weil die mikrobiologische Kontamination der Probe außerordentlich gering sein kann, wobei diese Kontamination gleichwohl von Relevanz beispielsweise für die Eignung von Wasser, aus dem die Probe entnommen wurde, als Trinkwasser sein kann. Bekannte Verfahren zur automatischen Fokussierung können daher in diesen Fällen in der Regel nicht mit Erfolg eingesetzt werden.

[0004] Im Hinblick auf die möglicherweise geringe Konzentration an Kontaminationen müssen ferner ausreichend große Proben untersucht werden, so daß mehrere Aufnahmen der Probe angefertigt werden müssen, die im Anschluß zu einem vollständigen Bild der Probe zusammengefügt werden müssen.

[0005] Im Stand der Technik sind Mikroskope zur elektronischen Bilderfassung großer Objektfelder bekannt, bei denen die Aufnahmepositionen zur Aufnahme von Teilbildern über motorische Antriebe in der Aufnahmeebene (x,y-Ebene) und die Fokuseinstellung (z-Achse) eingestellt werden.

Stand der Technik

[0006] Des Weiteren sind mikroskopische Vorrichtungen bekannt, deren zu untersuchende Objekte vorzugsweise mit UV-Licht beleuchtet werden und fluoreszierende Objekte von einer elektronischen Kamera aufgenommen werden. Eine derartige Vorrichtung wird beispielsweise in EP 0 339 582 A2 beschrieben.

[0007] Ein weiteres Problem besteht darin, daß die

Proben oft nicht ideal eben sind (Durchwölbung der Präparate, Unebenheit der Objektträger, u. ä.), so daß beim automatischen Abrastern der Probe ein einmaliges Einstellen der Schärfenebene für eine sichere Detektion von Kontaminationen nicht ausreicht, weshalb Kontaminationen außerhalb der Schärfenebene übersehen werden könnten.

[0008] Überdies ist in derartigen Fällen eine Bestimmung der Schärfenebene eines Teilbildes mittels bekannter Verfahren sehr zeitaufwendig und mit langen oder mehrfachen Belichtungen verbunden. Für die Untersuchung fluoreszierender Substanzen ist das zeitaufwendige, insbesondere mehrfach erforderliche Suchen der Schärfenebene jedoch nachteilig, da mit zunehmender Belichtung der Probe die fluoreszierenden Substanzen ihre Leuchtkraft verlieren, wodurch sie unsichtbar werden und das Ergebnis der Untersuchung verfälschen.

[0009] DE 101 01 624 A1 beschreibt ein Verfahren zur automatischen Scharfeinstellung eines optischen Systems. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des sogenannten Spitzen-Stop-Verfahrens, bei dem die Fokussierung eines Objektivs auf eine Probe durch eine schrittweise Bewegung der Probe (oder der Objektivlinse des Objektivs) entlang der optischen Achse der Objektivlinse in eine Position maximalen Kontrastes auf ebendieser optischen Achse erfolgt. Das in DE 101 01 624 A1 beschriebene Verfahren versagt jedoch, wenn es bei der Untersuchung ausgedehnter transparenter Proben verwendet werden soll, die nur sehr wenige oder keine Kontaminationen oder andere Gebilde enthalten.

[0010] DE 195 02 472 A1 offenbart ein Verfahren zum Erzeugen eines tiefenscharfen Bildes eines Objektes, bei dem eine Struktur auf das Objekt projiziert wird und Aufnahmen des gesamten Objektes in mehreren Schärfenebenen gefertigt werden. In der jeweiligen Schärfenebene befindliche Bereiche des Objektes werden scharf gesehen, wobei in jeder Schärfenebene zwei Gesamtbilder des Objektes aufgenommen werden, nämlich ein Bild des Objektes, auf dem die Struktur abgebildet ist, und ein Bild des Objektes ohne die Struktur. Bei der Struktur handelt es sich um ein regelmäßiges Raster, so daß das Bild, das in einer Schärfenebene das Objekt mit der Struktur zeigt (Rasterbild), in Bildbereiche zerlegt werden kann. Die Grauwertdifferenzen der Bildbereiche werden bestimmt, um ein Kontrastbild zu erhalten, wobei jedem Bildbereich ein Kontrastwert zugeordnet wird. Die Kontrastwerte eines Bildbereiches in einer bestimmten Position in einer Schärfenebene werden mit dem Bildbereich in der gleichen Position in anderen Schärfenebenen verglichen, um den Bildbereich mit maximalem Kontrast zu bestimmen. Hat ein Bildbereich den maximalen Kontrast, dann wird der entsprechende Bildbereich des Bildes, das ohne Struktur in derselben Schärfenebene aufgenommen wurde,

ausgewählt. Diese Bildbereiche werden dann zusammengesetzt, so daß eine gesamtscharfe Darstellung des Objektes erhalten wird. Aus der Ebenenzugehörigkeit der für die Darstellung verwendeten Bildbereiche ergibt sich das Höhenprofil.

[0011] In US 6,449,087 B2 wird ein Laserraster-Mikroskop verwendet, das eine "Sectioning"-Funktion aufweist. Mittels dieser Funktion wird eine Änderung des Kontrastes festgestellt, wenn eine unebene Probe abgebildet werden soll. Wird eine Änderung eines Kontrastes festgestellt, wird die Aperturblende so ein gestellt, daß die Tiefenschärfe der Höhe der Unebenheit entspricht. Das Höhenprofil wird nicht verwendet, um die Schärfentiefe zur Aufnahme von Teilbildern zu bestimmen, die außerhalb von zuvor festgelegten Meßpunkten liegen. Überdies wird das Höhenprofil für das Objekt nicht berechnet, sondern mittels eines Laserstrahls entlang einer Linie oder einer Vielzahl von Linien bestimmt. Eine Auswahl von Meßpunkten erfolgt somit. Das kann zur Folge haben, daß vereinzelte Kontaminationen nicht erkannt werden.

[0012] DE 196 53 413 C2 offenbart ein Rastermikroskop, das mehrere Mikrolinsen aufweist, die auf unterschiedliche Brennebenen einstellbar sind. DE 199 22 341 C2 beschreibt ein Verfahren zur Anordnung der räumlichen Koordinaten von Objektpunkten, wobei Objektkoordinaten im Terrain mit Hilfe von Referenzpunkten bestimmt werden.

Aufgabenstellung

[0013] Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein Verfahren zum Erzeugen eines Bildes von ausgedehnten Objekten mittels eines optischen Systems angegeben werden, das eine verbesserte, insbesondere schnellere und genauere Fokussierung auf das Objekt ermöglicht.

[0014] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 4.

[0015] Nach Maßgabe der Erfindung ist ein optisches Bilderzeugungsverfahren vorgesehen, umfassend die Schritte

- (a) Festlegen von mindestens 3 Meßpunkten (x_i, y_i) auf dem Aufnahmeobjekt;
- (b) Ermitteln der zugehörigen Schärfeebenen (z_k) für jeden dieser Meßpunkte;
- (c) Erzeugung eines Höhenprofils aus den ermittelten Schärfeebenen (z_k) für zumindest einen Bereich des Aufnahmeobjektes durch Interpolation und/oder Extrapolation;
- (d) Aufnahmen von Teilbildern in den interpolierten und/oder extrapolierten Bereichen des Höhenprofils, wobei für jedes Teilbild dessen Schärfee-

bene (z_k) aus dem Höhenprofil bestimmt wird;
 – (e) Zusammensetzen des zu erzeugenden Bildes aus den aufgenommenen Teilbildern.

[0016] Das Verfahren ermöglicht die Aufnahme einer Vielzahl von Teilbildern in vergleichsweise kurzer Zeit, da aus dem Höhenprofil die für die Aufnahme des jeweiligen Teilbildes erforderliche Schärfeebene bestimmt werden kann. Es ist also nicht erforderlich, die Schärfeebene durch Anwendung bekannter Verfahren zur automatischen Fokussierung für jedes einzelne Bild gesondert zu bestimmen.

[0017] Der Begriff "Objekt" und der Begriff "Probe" werden in der vorliegenden Beschreibung synonym verwendet.

[0018] Die Anzahl der Meßpunkte sollte so auf dem Objekt verteilt sein, daß ein Höhenprofil aus den für jedem Meßpunkt ermittelten Schärfeebenen durch Interpolation zwischen den Meßpunkten und durch Extrapolation außerhalb der von den Meßpunkten begrenzten Fläche berechnet werden kann.

[0019] Unter dem Ausdruck "Festlegen einer Anzahl n von Meßpunkten" ist zu verstehen, daß sowohl die Anzahl n der Meßpunkt als auch deren Position x_n, y_n in der x,y-Ebene festgelegt wird.

[0020] Die Meßpunkte werden auf dem Objekt vorzugsweise so gewählt, daß sie gleichmäßig über das Objekt verteilt sind. Besonders bevorzugt sollten sich Meßpunkte am Rand des Objektes und in dessen Zentrum befinden, wobei Rand und Zentrum des Objektes nach einem Ausmessen des Objektes bestimmt werden.

[0021] Vorzugsweise wird in Schritt (b) die Schärfeebene für jeden Meßpunkt durch Messung des relativen Kontrastes bei einer schrittweisen Bewegung des Objektes oder einer Objektivlinse des optischen Systems entlang einer optischen Achse (z-Achse) der Objektivlinse gemessen und der maximale Kontrast des Objektes für diesen Meßpunkt bestimmt.

[0022] Bei ausgedehnten Objekten werden die Meßpunkte zweckmäßigerweise durch Bewegen des Objektes in der Aufnahmeebene (x,y-Ebene) relativ zu der Objektivlinse des optischen Systems angesteuert. Unter einem ausgedehnten Objekt im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Objekt verstanden, das aus mehreren Teilbildern besteht. Hat beispielsweise die Probe einen Durchmesser von 1,5 cm, so müssen bei einer Teilbildgröße von 1 mm² mindestens 176 Teilbilder aufgenommen werden, wozu die Probe abgerastert wird. Die Kontaminationen haben eine Größe von wenigen Quadratmikrometern. Die Größe eines Teilbildes hängt von der Auflösung der verwendeten Kamera ab.

[0023] Unter Schärfeebene wird die Schärfe eines Teilbildes verstanden. Zur Bestimmung der Schärfeebene können die allgemein bekannten Verfahren verwendet werden. Vorzugsweise wird jedoch in Schritt (b) die Schärfeebene durch Bestimmung des maximalen Kontrastes ermittelt.

[0024] Zur Aufnahme von Teilbildern ausgedehnter Objekte wird das Objekt zweckmäßigerweise in der Aufnahmeebene (x,y-Ebene) relativ zu der Objektivlinse des optischen Systems bewegt. Dabei sollte das Objekt derartig abgerastert werden, daß jeweils für aneinander angrenzende Teilbereiche des Objektes Teilbilder aufgenommen werden. Die Schärfeebene für jeden Teilbereich bzw. das Teilbild, das für jeden Teilbereich erhalten werden soll, wird aus dem Höhenprofil berechnet.

[0025] Optisch sichtbare Markierungen sind Markierungen, die sich deutlich von den zu detektierenden Objekten unterscheiden, von denen besonders Markierungen mit anderen Farben und Formen bevorzugt werden, die durch Bildauswerteprogramme sehr einfach von den Kontaminationen unterschieden werden können. Geeignete Marker zur Erzeugung derartiger Markierungen sind beispielsweise Cyaninfarbstoffe.

[0026] Sollte sich nur eine geringe Zahl an Gebilden oder keine Gebilde in der Probe befinden, die optisch erfaßt werden können, so kann es ferner zweckmäßig sein, optisch sichtbare Markierungen, d. h. Marker, in die Probe einzubringen, wobei die Position der optisch sichtbaren Markierungen in der Aufnahmeebene des optischen Systems als Meßpunkt verwendet werden kann. Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Meßpunkte können alle auf der Verwendung derartiger Markierung beruhen. Es ist jedoch auch möglich, neben Meßpunkten, die sich aus der Verwendung derartiger Markierung ergeben, auch Meßpunkte zu verwenden, die sich aus bereits in dem Objekt vorhandenen Gebilden ermitteln lassen.

[0027] Die Marker können gleichmäßig über das Objekt verteilt werden oder an ausgewählten Orten auf das Objekt aufgebracht werden, vorzugsweise am Rand und im Zentrum des Objektes.

[0028] Das Verfahren läßt sich mit jedem optischen System durchführen, das eine Bewegung des Objektes in der Aufnahmeebene (x,y-Ebene) relativ zu dem Objektiv des optischen Systems ermöglicht und das ferner eine Bewegung des Objektes relativ zu dem Objektiv des optischen Systems entlang der optischen Achse (z-Achse) der Objektivlinse des Objektives ermöglicht.

[0029] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung wird nachfolgend mit Bezug auf die beigefügten Zeichnungen ausführlicher beschrieben. Dabei zeigen

[0030] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung eines optischen Systems, das zum Ausführen des Verfahrens der vorliegenden Erfindung geeignet ist;

[0031] [Fig. 2](#) eine schematische Darstellung einer Probe, auf die optisch sichtbare Markierungen aufgebracht sind; und

[0032] [Fig. 3](#) eine schematische Darstellung eines Höhenprofils, das für die in [Fig. 2](#) gezeigte Probe ermittelt worden ist.

[0033] Gemäß [Fig. 1](#) wird als optisches System ein Fluoreszenzlicht-Mikroskop **1** mit Objektiv **1.1** mit einer Objektivlinse **1.2** verwendet, wobei das Mikroskop **1** ferner eine Beleuchtungseinheit **2** umfaßt einen Objektisch **13** zur Aufnahme des abzubildenden Objektes **8**, motorische Verstelleinrichtungen zum Bewegen des Objektisches **13**, auf den das Objekt **8** aufgebracht werden kann, in x-, y- und z-Richtung **3** (M1), **4** (M2), **5** (M3), eine Bilderfassungseinheit **6** sowie eine Rechneinheit **7** zur Steuerung der Relativbewegungen zwischen Objektisch **13** und Objektivlinse **1.2**, zur Festlegung der Meßpunkte, Speicherung der für die Meßpunkte ermittelten Schärfeebenen, Berechnung des Höhenprofils und daraus der Schärfeebene für die Teilbilder sowie zum Zusammenfügen der Teilbilder zu einem Bild des Objektes.

[0034] In [Fig. 2](#) ist ein zu untersuchendes Präparat dargestellt. Es besteht aus einem Objektträger **9**, einem Objekt **8** aus einem Filterplättchen, auf dem sich markierte Kontaminationen **11** und in die Probe eingebrachte, optisch sichtbare Markierungen **12** befinden.

[0035] Dieses Präparat wird auf den Objektisch **13** aufgebracht. Sodann wird die Probe mittels der Verstelleinrichtungen **3**, **4** in die erste Aufnahmeposition (x_1, y_1) in der x,y-Ebene bewegt, in der eine Markierung **12** in der Probe enthalten ist. Anschließend bewegt die Versteileinrichtung **5** die Probe schrittweise in z-Richtung. In jeder Aufnahmeposition $z_{1,d}$ wird eine Bildaufnahme mit der Bilderfassungseinheit **6** durchgeführt und mit geeigneten Algorithmen z. B. der Kontrast in dem erhaltenen Bild bestimmt. Der relative Kontrast wird für jeden dieser Schritte d in z-Richtung bestimmt und nach Durchlaufen aller Schritte die Position ($z_{1,dmax}$) mit dem maximalen Kontrast für die Position (x_1, y_1) gespeichert. Danach wird dieser Vorgang für die Aufnahmepositionen mit anderen Markierungen durchgeführt und die jeweiligen Werte ($x_2, y_2, z_{2,dmax}; x_n, y_n, z_{n,dmax}$) bestimmt.

Patentansprüche

[0036] Aus den gewonnenen Werten wird im einfachsten Fall durch Berechnung eines ebenen Flächensegmentes das durch drei benachbarten Werte ($x_n, y_n, z_{n,dmax}$) aufgespannt wird, ein Höhenprofil berechnet. Ein Beispiel eines solchen Höhenprofils ist in **Fig. 3** dargestellt. Bei der Berücksichtigung von mehr als drei Meßpunkten können auch gekrümmte Flächen berechnet werden, wodurch die Genauigkeit der Schärfeebene erhöht wird.

[0037] Zur Aufnahme der Teilbilder, aus denen das Bild dann zusammengesetzt werden soll, werden dann nach einem vorgegebenen Algorithmus (z. B. Matrixabtastung, kreisförmige Abtastung oder andere dem Fachmann bekannte Verfahren) die Aufnahmepositionen (x'_m, y'_m) angefahren, der dazugehörige Fokuspunkt (z'_m) aus dem zuvor bestimmten Höhenprofil berechnet, durch die Verstellvorrichtung **5** angefahren, das Teilbild für diese Aufnahmeposition aufgenommen und in der Rechneinheit **7** abgespeichert. Nach Durchlaufen aller Aufnahmepositionen (x'_m, y'_m, z'_m) werden die (beispielsweise ca. 1000) Teilbilder im Speicher der Rechneinheit **7** zusammengefügt, so daß man ein vollständiges elektronisches Abbild des Objektes **8** mit einer ausreichenden Schärfe in kürzester Zeit erhält, die es gestattet, eine Bildauswertung vorzunehmen.

[0038] Die verwendeten Symbole haben folgende Bedeutung:

n	Anzahl der Meßpunkte
m	Anzahl der Teilbilder (= Anzahl der Aufnahmepositionen)
x,y	Koordinaten in der Aufnahmeebene
z	Koordinate parallel zur optischen Achse des Objektivs
d	Anzahl der Schritte auf der z-Koordinate
d_{max}	z_d -Wert mit maximalem Kontrast
$x_n, y_n, z_{n,dmax}$	Position der Meßpunkte
x'_m, y'_m, z'_m	Position zur Aufnahme der Teilbilder (Aufnahmeposition)

Bezugszeichenliste

1	Mikroskop
1.1	Objektivlinse
1.2	Objektiv
2	Beleuchtungseinheit
3	Verstelleinrichtungen für die x-Koordinate
4	Verstelleinrichtungen für die y-Koordinate
5	Verstelleinrichtungen für die z-Koordinate
6	Bilderfassungseinheit
7	Rechneinheit
8	Objekt (Filterplättchen)
9	Objektträger
11	Kontaminationen
12	optisch sichtbare Markierungen
13	Objekttisch

1. Optisches Bilderzeugungsverfahren, umfassend die Schritte

- Festlegen von mindestens 3 Meßpunkten (x_i, y_i) auf dem Aufnahmeobjekt;
- Ermitteln der zugehörigen Schärfeebenen (z_k) für jeden dieser Meßpunkte;
- Erzeugung eines Höhenprofils aus den ermittelten Schärfeebenen (z_k) für zumindest einen Bereich des Aufnahmeobjektes durch Interpolation und/oder Extrapolation;
- Aufnehmen von Teilbildern in den interpolierten und/oder extrapolierten Bereichen des Höhenprofils, wobei für jedes Teilbild dessen Schärfeebene (z_k) aus dem Höhenprofil bestimmt wird;
- Zusammensetzen des zu erzeugenden Bildes aus den aufgenommenen Teilbildern.

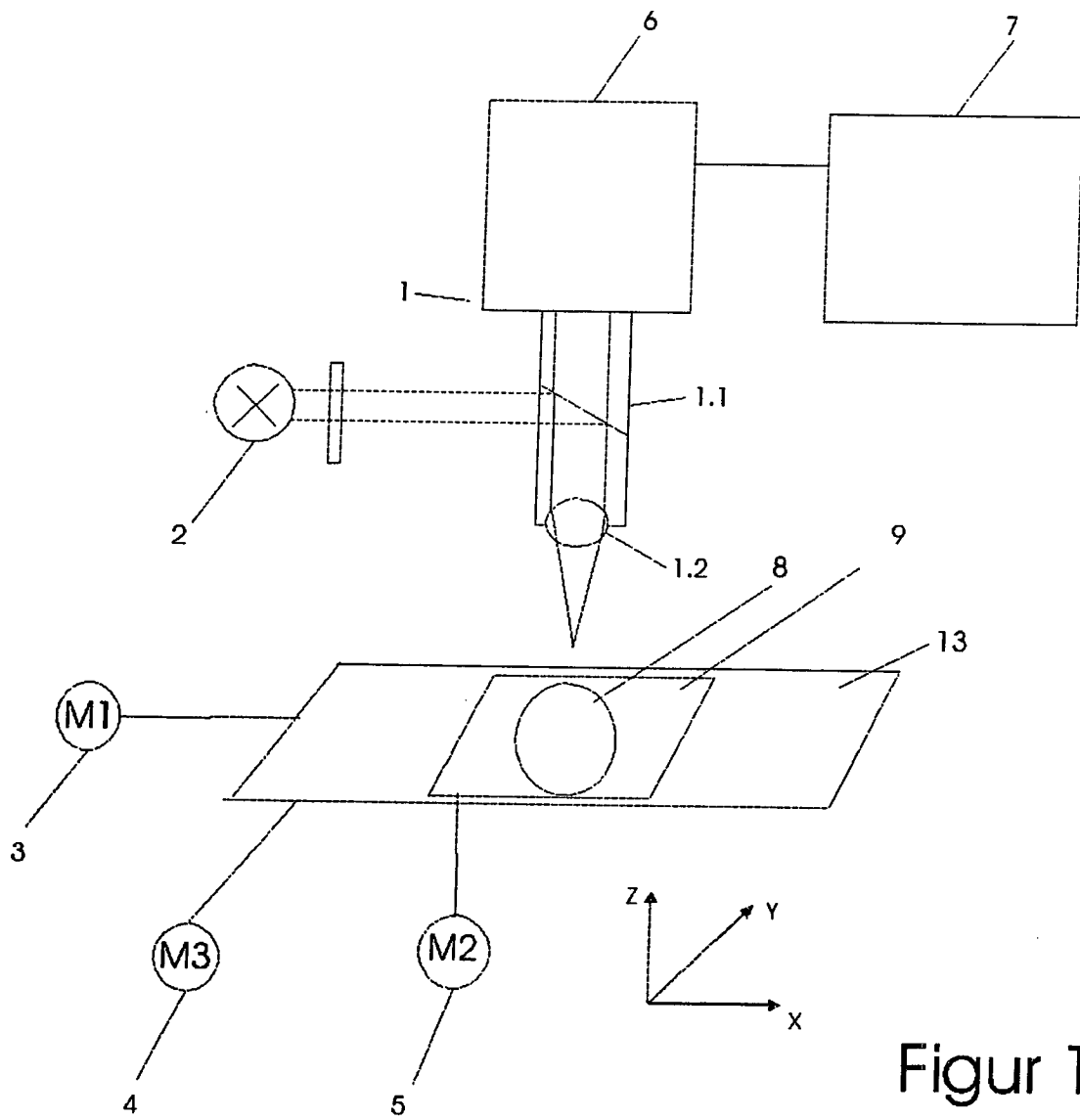
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung der Schärfeebene (z_k) eines jeden Meßpunktes der Abstand zwischen Objekt und Objektiv schrittweise geändert und dabei die Folge der zugehörigen Relativkontraste gemessen wird, und daß aus dieser Folge der Maximalkontrast ausgewählt und damit die Schärfeebene (z_k) des jeweiligen Meßpunktes festgelegt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Markierungen in das Objekt eingebracht und durch diese die Meßpunkte festgelegt werden.

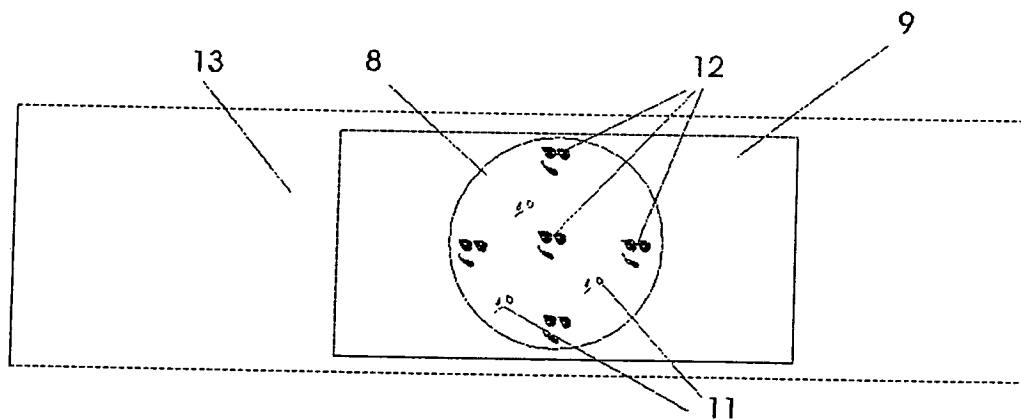
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Anfahren der Meßpunkte und/oder zur Aufnahme der Teilbilder das Objekt in der Aufnahmeebene relativ zu der Objektivlinse bewegt wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

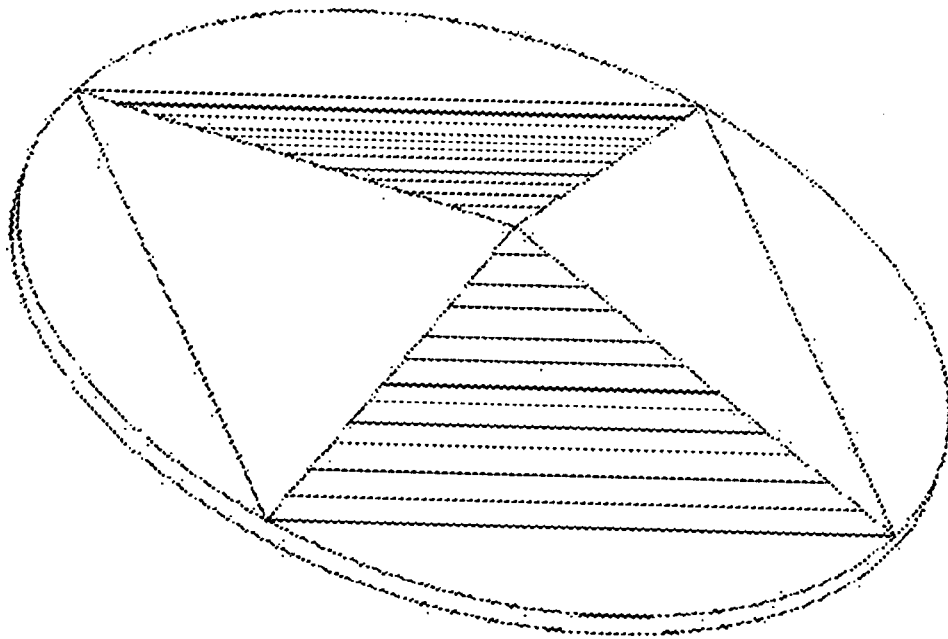
Anhängende Zeichnungen



Figur 1



Figur 2



Figur 3