

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 952**

51 Int. Cl.:

G02B 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2007 E 07854894 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2092385**

54 Título: **Fuente de iluminación para microscopio que comprende diodos emisores de luz para muestras biológicas teñidas**

30 Prioridad:

14.12.2006 US 611123

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.12.2013

73 Titular/es:

**CYTYC CORPORATION (100.0%)
250 CAMPUS DRIVE
MARLBOROUGH, MA 01752, US**

72 Inventor/es:

**ZAHNISER, DAVID J. y
PARSONS, DANIEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 434 952 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fuente de iluminación para microscopio que comprende diodos emisores de luz para muestras biológicas teñidas

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere en general al campo de la citología y la histología. Más específicamente, el campo de la invención se refiere a dispositivos y métodos para la iluminación de muestras biológicas teñidas usando uno o más diodos emisores de luz (LED).

Antecedentes de la invención

10 La mayoría de los microscopios utilizan lámparas incandescentes convencionales para la iluminación de muestras biológicas teñidas. Las lámparas incandescentes producen luz blanca que es una combinación de todos los colores en el espectro visible (desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 700 nm). Infortunadamente, las lámparas incandescentes producen un calor considerable, tienen baja eficiencia energética, y a menudo deben ser reemplazadas en forma frecuente.

15 Los diodos emisores de luz (LED) son fuentes de luz conocidas que producen típicamente un solo color, que cubre solamente una banda estrecha en el espectro visible. Por ejemplo, los LED que producen bandas estrechas de luz centradas en 450 nm, 525 nm y 625 nm aparecerán para el ojo humano como azul, verde, y rojo, respectivamente. El color es visualizado por los seres humanos utilizando células especializadas en el ojo. En particular, el ojo humano contiene tres tipos de células receptoras de color. Estas incluyen los llamados conos S, conos M, conos y conos L que detectan longitudes de onda corta, media y larga, respectivamente, de la luz visible. Todos los tres tipos de células tipo cono son sensibles a una banda ancha de longitudes de onda, pero tienen diferentes sensibilidades máximas. Por ejemplo, los conos S son más sensibles en torno a 420 nm (azul), mientras que los conos M son sensibles alrededor de 534 nm (verde) y los conos L son sensibles alrededor de 564 nm (rojo).

20 El ojo integra esencialmente la función espectral, produciendo tres señales. Una señal es la intensidad de la luz. Otra diferencia a la luz azul de la amarilla. Finalmente, la tercera separa la luz amarilla en luz roja o verde. Esta integración del espectro promedia los colores juntos. La luz de un LED amarillo (590 nm), parecerá la misma para el ojo que la luz de los LED verde y rojo combinados (530 nm y 650 nm), ya que en ambos casos, se equilibran el rojo y el verde y preponderará el azul.

25 La combinación de diferentes intensidades de luz roja, verde y azul puede crear la apariencia de casi cualquier color. Por ejemplo, un sistema de iluminación de microscopio que utiliza LED separados de color rojo, verde, y azul se puede ajustar a cualquier color de iluminación, dependiendo de las preferencias del operador.

30 En aplicaciones típicas de formación de imágenes microscópicas, se necesita una luz blanca como la luz emitida por las bombillas incandescentes convencionales para iluminar la muestra biológica. Los patólogos y otras personas entrenadas para observar muestras biológicas relacionadas con estados de enfermedad están familiarizados con el análisis de las muestras iluminadas con una fuente de luz de banda ancha, incandescente. Se han hecho intentos de utilizar LED para imitar la luz blanca emitida por fuentes incandescentes convencionales. Por ejemplo, se han producido LED individuales que generan una mezcla de luces de colores que se asemeja a la luz blanca. Por ejemplo, en el diseño mencionado anteriormente, la luz azul es emitida desde un diodo semiconductor de nitruro de galio (alrededor de 460 nm). Luz secundaria, en el intervalo de aproximadamente 550 nm hasta aproximadamente 650 nm es emitida por un revestimiento de fósforo localizado dentro de una camisa de polímero. La combinación de longitudes de onda produce luz "blanca" que tiene una temperatura de color relativamente alta. Un problema con los LED del tipo descrito anteriormente es que no son buenos en la producción de luz en longitudes de onda relativamente largas (por ejemplo, luz roja).

45 En aún otro diseño, la luz de los LED de color rojo, verde y azul se combina para producir una iluminación que parece ser blanca, pero no contiene el espectro visible completo. En particular, la intensidad de la iluminación en la banda amarilla (alrededor de 565 nm a 590 nm) es muy baja. Este vacío en la porción amarilla del espectro hace que algunas muestras de células teñidas parezcan ser de un color diferente al que se obtendría si se iluminaran con una lámpara incandescente. Esto es problemático porque la muestra biológica teñida parecerá diferente a un patólogo u otra persona capacitada bajo la luz blanca formada por LED en comparación con la luz blanca incandescente convencional. Los patólogos, sin embargo, se entrenan típicamente en microscopios que utilizan fuentes de luz incandescente de banda ancha. Diferente apariencia visual pueden dar lugar a confusión y mala interpretación de los resultados de la platina del microscopio.

50 El documento US 2003/042493 A1 describe una fuente luz de estado sólido que comprende una fuente de luz de semiconductores que emite luz y un sistema óptico que tiene un elemento de fibra óptica. El elemento de fibra

óptica tiene una entrada para recibir la luz emitida por la fuente de luz de semiconductores. El elemento de fibra óptica tiene también una salida para emisión de la luz recibida de la fuente de luz de estado sólido. La fuente de luz de semiconductores y el elemento de fibra óptica en conjunto forman una trayectoria de iluminación.

5 El documento DE 199 62 779 A1 da a conocer un dispositivo que tiene un primera unidad óptica con al menos una unidad de iluminación que tiene al menos un diodo de luz para dirigir luz visible roja, verde y azul bajo en un ángulo dado a una superficie que va a ser medida. Una segunda unidad óptica en un ángulo dado con la superficie tiene al menos un fotosensor para detectar la luz reflejada desde la superficie. Una unidad que sirve de filtro está dispuesta entre los diodos de luz y el fotosensor. Una unidad de control y evaluación controla el proceso de medición y evalúa al menos una característica de la luz reflejada, para caracterizar la superficie. La unidad de control y evaluación tiene al menos una unidad de procesamiento y al menos una unidad de memoria.

10 El documento EP 1510847 A1 describe un microscopio que tiene un dispositivo de iluminación ubicado en la parte superior integrado en la estructura de un microscopio con al menos un diodo emisor de luz que emite luz blanca, una óptica de iluminación y un elemento de deflexión dispuesto de manera que el plano del objeto pueda ser iluminado con la luz de iluminación por medio del método de iluminación coaxial ubicado en la parte superior.

15 El documento EP 1150154 A1 divulga un sistema de iluminación que comprende varios anillos concéntricos de LED de luz blanca con un pequeño ángulo de radiación fijado en un soporte anular. Los LED en las hileras anulares tienen la misma distancia lateral una debajo de la otra. Los LED se pueden controlar de forma individual o en grupos y/o se pueden regular en relación con el brillo. Los LED están conectados en grupos en serie, de modo que a cada grupo se le asigna una fuente de corriente constante controlable, que está conectada, respectivamente, con una salida de un convertidor digital-análogo.

20 El documento GB 2348968 A divulga una lupa iluminada que tiene una lente sostenida en su lugar por un soporte para lentes. Se asegura un LED al soporte de la lente de tal manera que el LED ilumina un área que está siendo observada por la lente. El LED puede tener la forma de un ordenamiento y puede estar soportado por un soporte para LED, que a su vez puede ser asegurado en forma removible al soporte de la lente. El LED puede ser un LED gran angular de alta intensidad. Una fuente de alimentación para alimentar el LED también puede ser incluido y también se puede conectar el LED a un circuito de control por medio de un conductor eléctrico.

25 El documento US 2005/231713 A1 divulga una cámara, fuentes de luz, lentes y los algoritmos de software utilizados para formar imágenes e inspeccionar las estructuras semiconductoras, incluida la radiación infrarroja. También se describe el uso de diferentes configuraciones de iluminación de estado sólido y los algoritmos de software mejoran la formación de la imagen y la inspección.

30 Resumen de la invención

Un primer aspecto de la invención provee un sistema de iluminación de microscopio de acuerdo con la reivindicación 1. Cada uno de las al menos cuatro fuentes de luz LED puede ser controlable de forma independiente. La luz resultante emitida de las al menos cuatro fuentes de luz LED se aproxima sustancialmente a aquella de una fuente de luz incandescente. Las al menos cuatro fuentes de luz LED pueden ser de cualquier color que, al combinarse, imitan muy de cerca la luz emitida por una fuente de luz incandescente o de banda ancha. El sistema de iluminación puede incluir una pluralidad de LED de cada color. En aún otra forma de realización, el sistema de iluminación puede comprender un solo LED rojo, verde, y azul y múltiples LED amarillos. Aún son posibles otras combinaciones. Por ejemplo, los cuatro colores de los LED pueden incluir violeta, azul, amarillo, verde y anaranjado.

40 En una forma de realización de la invención, el sistema de iluminación incluye uno o más circuitos de control operativamente conectados a los cuatro colores de LED. Por ejemplo, un primer circuito puede ser utilizado para controlar los colores RGB, mientras que un segundo circuito puede ser utilizado para controlar el LED amarillo. Como otra alternativa, cada color (rojo, verde, azul, y amarillo) puede ser controlado por circuitos individuales. En otra forma de realización, el brillo de los LED de colores individuales puede ser controlado en forma independiente.

45 Los cuatro LED de colores pueden estar separados o estar integrados en un único módulo o en múltiples módulos. Por ejemplo, los LED RGB puede estar en un módulo, mientras que los LED amarillos se encuentran en un módulo separado.

Breve descripción de los dibujos

50 Se describirán y explicarán ahora diferentes formas de realizaciones de la invención en forma más específica y detallada a través de la utilización de los dibujos que se acompañan, en los que:

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un sistema de iluminación con base en LED de acuerdo con una forma de realización de la invención.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente un sistema de iluminación con base en LED de acuerdo con otra forma de realización de la invención.

La Figura 3 ilustra una forma de realización en la cual los cuatro LED de colores están cada uno controlados por un circuito de control separado.

- 5 La Figura 4 ilustra una fuente de luz con base en LED que tiene un LED rojo, un LED verde, un LED azul que está rodeado por una pluralidad de LED amarillos.

- 10 La Figura 5 ilustra otra fuente de luz con base en LED, en la cual un primer módulo contiene LED de color rojo, verde y azul. Se proporciona un segundo módulo que incluye al menos un LED amarillo. Los dos módulos están dispuestos con respecto a un divisor de haz de modo que la luz amarilla se combina con la luz roja, verde y azul para formar luz blanca para iluminar una muestra. La forma de realización de la Figura 5 no forma parte de la invención.

La Figura 6 ilustra un gráfico de intensidad de la luz en función de la longitud de onda para un sistema de iluminación con base en LED de cuatro colores (rojo, verde, azul, y amarillo).

- 15 La Figura 7 ilustra un gráfico de intensidad de la luz en función de la longitud de onda para un sistema de iluminación con base en LED de cuatro colores (rojo, verde, azul, y amarillo). También se muestra el espectro de absorción de la tintura Eosina Y.

Descripción detallada de las formas de realización ilustradas

- 20 La Figura 1 ilustra esquemáticamente un sistema de iluminación de un microscopio 10. En un sentido amplio, el sistema de iluminación del microscopio 10 incluye una iluminación o fuente de luz 12 que incluye al menos cuatro LED separados. Los LED incluyen al menos un LED rojo, al menos un LED verde, al menos un LED azul, y al menos un LED amarillo. Los colores referenciados anteriormente se refieren al color de la luz emitida desde el LED respectivo. Por ejemplo, el LED rojo generalmente emite luz en el intervalo de aproximadamente 625 nm hasta aproximadamente 660 nm. El LED verde generalmente emite luz en el intervalo de aproximadamente 480 nm hasta aproximadamente 575 nm. El LED azul generalmente emite luz en el intervalo de aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 500 nm. El LED amarillo generalmente emite luz en el intervalo de aproximadamente 575 nm hasta aproximadamente 625 nm. Por supuesto, estos intervalos pretenden abarcar la mayor parte de la luz transmitida desde cada LED respectivo y se espera que se presenten algunas emisiones más allá del intervalo establecido.

- 30 Como se explica en forma más detallada a continuación, la adición del LED amarillo llena un vacío en el espectro de emisión del sistema de iluminación del microscopio 10 si se utilizan únicamente LED rojo, verde, y azul como fuente de iluminación. En este sentido, la adición del LED amarillo permite que la apariencia de muestras biológicas observadas bajo el sistema de iluminación del microscopio con base en LED se parezca mucho más a las mismas muestras observadas bajo el sistema incandescente convencional. En este sentido, los patólogos y otros profesionales entrenados son capaces de visualizar mejor ciertas estructuras y aspectos de la muestra biológica. Por ejemplo, cuando se utilizan ciertas coloraciones tales como Eosina Y y colorante G anaranjado, las células y estructuras celulares iluminadas únicamente con luz RGB (rojo, azul, verde) de los LED aparecen visualmente diferentes para un usuario en comparación con los mismos objetos iluminados con una fuente convencional de luz incandescente de banda ancha. La adición del LED amarillo disminuye este problema.

- 40 Volviendo a la Figura 1, un propósito de un sistema de iluminación de un microscopio 10 es proporcionar una fuente de luz "blanca" para obtener imágenes de un espécimen biológico (por ejemplo, citológico) 12 sobre un portaobjetos de microscopio 14 utilizando una pluralidad de diferentes LED de colores 16. La fuente de iluminación incluye al menos un LED rojo 16R, al menos un LED verde 16G, al menos un LED azul 16B, y al menos un LED amarillo 16Y. Cada LED 16 puede ser un LED de alto brillo, de tal manera que una luz blanca brillante sea capaz de iluminar el espécimen biológico 12 para su visualización. La pluralidad de LED se puede formar a partir de una combinación de LED discretos individuales, o un módulo personalizado con base en LED de múltiples matrices. Por ejemplo, se pueden ensamblar los LED individuales para formar un subconjunto de componentes para iluminación fuera de la plataforma. Alternativamente, se puede utilizar un módulo a base de LED en el que se montan matrices de LED individuales sobre un sustrato común 18 (como se muestra en las Figs. 1 y 2).

- 50 Los LED 16 generan calor, y como la temperatura de un LED aumenta, se desplazan las longitudes de onda de salida. La cantidad de calor generado depende de la corriente a la cual se controla el LED y el lapso de tiempo durante el cual se aplica la corriente. Para aumentar la salida de luz desde el dispositivo sin que se produzca calor suficiente para provocar que se desplace la longitud de onda, los LED 16 pueden ser controlados con un circuito de pulsos 20 que, en ciertas formas de realización, se sincroniza con una cámara 22 del sistema de formación de imágenes 10 para suministrar pulsos cortos intensos de luz a la cámara 22 durante el periodo de integración de la

cámara. En esta forma de realización, la cámara 22 amplifica y captura imágenes de la muestra biológica 12 para una observación y/o análisis posterior. Desde luego, los LED 16 no tienen que ser sincronizados con la cámara 22 si, por ejemplo, el sistema de iluminación del microscopio 10 fue utilizado por un operador humano. En esta forma de realización, la cámara 22 puede ser reemplazada con óptica de amplificación convencional (por ejemplo, lentes de objetivo y similares). En esta aplicación, los LED 16 serían alimentados continuamente - no habría necesidad de sincronización.

Volviendo a la Figura 1, en la forma de realización que utiliza una cámara 22, el pulso del LED se sincroniza con la integración del marco de la cámara proporcionando un disparador externo que activa tanto la cámara / capturador de imágenes 24 como el controlador de pulsos 20 del LED, por ejemplo, utilizando un generador de onda cuadrada 26. La cámara 22 no responde instantáneamente al disparador. Para compensar este retardo, el circuito controlador de pulsos 20 tiene un retardo programable que se utiliza para sincronizar los sistemas. Por supuesto, son posibles otros métodos de sincronización, dependiendo del tipo de cámara y la implementación real.

El sistema de iluminación 10 puede incluir un procesador 29, tales como un ordenador personal que puede ser utilizado para controlar la adquisición y el almacenamiento de imágenes tomadas a través de la cámara 22. El procesador 29 puede coordinar las diferentes funciones de la secuencia de formación de imágenes y también retener o transmitir imágenes digitales de los especímenes biológicos 12.

Los LED 16 inherentemente producen una salida de luz espacialmente no uniforme y algunas aplicaciones ópticas requieren una iluminación razonablemente uniforme de la muestra. Para situaciones en las que la uniformidad es un problema, se pueden utilizar dos tipos de sistemas para la generación de iluminación espacialmente uniforme con los LED 16, a saber, sistemas Koehler y de fibra óptica. Los LED 16 utilizados en cualquiera de estos sistemas pueden ser LED 16 discretos empaquetados en forma muy estrecha o múltiples matrices de LED 16 pueden estar integrados en un único sustrato 18 para producir una disposición más densa.

La iluminación Koehler (como se observa en las Figs. 1 y 2) es una técnica estándar para producir una iluminación uniforme de un portaobjetos de microscopio 14 a partir del filamento espacialmente no uniforme de una lámpara incandescente utilizada en iluminadores de microscopio tradicionales. Como se ha determinado por medio de ensayos, esta técnica es igualmente efectiva para lograr la uniformidad cuando se emplea con los LED 16. En una forma de realización del sistema de iluminación con base en LED 10, los LED individuales 16 se empaquetan estrechamente y se colocan en la posición general del filamento de la lámpara en el iluminador tradicional de Koehler 28.

En otra forma de realización para lograr la uniformidad, como se observa en la Figura 2, se acoplan múltiples LED 16 en una fibra óptica de núcleo grande 30 (alrededor de 500 a 600 μm) con lentes u otros aparatos ópticos. La patente de los Estados Unidos No. 6.665.060, que se incorpora por referencia como si hubiera sido expuesta en su totalidad en este documento da a conocer lentes que se pueden utilizar con los LED 16. Se selecciona la longitud de la fibra 30 de modo que la falta de uniformidad espacial de los LED 16 se mezclan entre sí y se logra una salida espacial relativamente uniforme de la fibra 30. En la práctica, la salida de la fibra 30 es aproximadamente gaussiana en el perfil espacial. La fibra 30 puede tener que ser desplazada del portaobjetos del microscopio 14, de tal manera que sólo se utiliza la parte central, relativamente plana, de la salida. Como una alternativa a los LED 16 individuales, se pueden colocar múltiples matrices de LED (tales como la que se muestra en las Figs. 1 y 2) en un único sustrato 18. Se pueden colocar lentes individuales encima de cada matriz de modo que la radiación de cada matriz se recoge en un cono estrecho. En ciertas formas de realización, el iluminador de Koehler 28, 30 puede ser omitido por completo.

Como se explicó anteriormente, el LED amarillo 16Y en las Figuras 1 y 2 llena un vacío en el espectro de emisión de luz emitida usando LED RGB 16R, 16G, 16B. La intensidad de la iluminación en la región amarilla del espectro (aproximadamente 565 nm hasta aproximadamente 590 nm) es llenada por la presencia de al menos un LED amarillo 16Y. Mientras que las Figuras 1 y 2 ilustran un único LED amarillo 16Y, en algunas formas de realización se pueden utilizar múltiples LED amarillos 16Y. Por ejemplo, en una configuración, una pluralidad de LED amarillos 16Y rodean o encierran una porción interior que contiene LED RGB 16R, 16G, 16B o matrices de LED (véase, por ejemplo, la Fig. 4).

En una forma de realización de la invención, tal como se muestra en la Figura 3, la pluralidad de los LED 16R, 16G, 16B, 16A y son controlados por circuitos controladores independientes. Es decir, al menos un LED rojo 16R es controlado por un primer circuito controlador 40R, al menos un LED verde 16G es controlado por un segundo circuito controlador separado 40G, al menos un LED azul 16B es controlado por un tercer circuito controlador separado 40B, y al menos un LED amarillo 16Y es controlado por un cuarto circuito controlador separado 40Y. La Figura 3 ilustra esta forma de realización en la que un circuito controlador separado 40R, 40G, 40B, 40Y está asociado con cada LED respectivo 16R, 16G, 16B, y 16Y.

El circuito controlador 40R, 40G, 40B, 40Y incluye típicamente una fuente de corriente para aplicar corriente eléctrica

a los LED 16R, 16G, 16B, y 16Y. La luz es emitida desde el diodo cuando la corriente es polarizada directamente a través de la unión p-n del LED. Los circuitos controladores 40R, 40G, 40B, 40Y son capaces de ajustar el brillo de cada LED 16R, 16G, 16B, 16Y independientemente uno del otro. Por ejemplo, el brillo del LED amarillo 16Y se puede ajustar independientemente de los LED rojo, verde, y azul 16R, 16G, 16B. Los niveles de brillo se ajustan mediante modulación del ancho de pulso. Por ejemplo, para lograr un nivel de brillo de 10%, se pulsa la corriente en un estado "encendido" durante 10% del tiempo y en un estado "apagado" durante 90% del tiempo. La modulación del ancho de pulso es un método conocido para controlar los niveles de brillo del LED. Los circuitos controladores 40R, 40G, 40B, 40Y se pueden implementar utilizando uno o más microprocesadores.

Las Figuras 4 y 5 ilustran dos ejemplos de configuraciones para una fuente de luz con base en LED 50 para el sistema de iluminación 10. En la Figura 4, una serie de LED amarillos 16Y rodean un módulo de LED 42 que tiene LED rojo, verde y azul 16R, 16G, 16B. Los LED amarillos 16Y están dispuestos de una manera simétrica alrededor del módulo del LED 42. La Figura 5, que no forma parte de la invención, ilustra otra configuración de una fuente de luz con base en LED 50 en el que un módulo 42 que contiene LED rojo, verde y azul 16R, 16G, 16B emite radiación en un divisor de haz BS. Un módulo separado 42 que contiene un LED amarillo 16Y se coloca generalmente en forma perpendicular a la trayectoria óptica del módulo RGB 42 de tal manera que la luz amarilla emitida desde el LED amarillo 16Y se combina o se fusiona con la luz roja, verde y azul transmitida a través del divisor del haz. Por supuesto, las fuentes de luz con base en LED 50 de las Figuras 4 y 5 son ilustrativas y se contemplan otras configuraciones que combinan LED rojo, verde, azul, amarillo 16R, 16G, 16B, 16Y dentro de la invención.

La presencia del LED amarillo 16Y llena el vacío en esta región del espectro visible (aproximadamente 565 nm hasta aproximadamente 590 nm). La Figura 6 ilustra el espectro de un sistema de iluminación 10 que utiliza LED rojo, verde, azul y amarillo 16R, 16G, 16B, y 16Y. La adición de este cuarto color (es decir, amarillo) hace que las muestras biológicas teñidas (por ejemplo, células) parezcan estar mucho más cerca de los colores percibidos si las muestras se iluminaron con una fuente de luz incandescente de banda ancha. Por ejemplo, la invención es de particular interés para las muestras biológicas teñidas que utilizan coloraciones biológicas tales como Eosina Y ($C_{20}H_{16}Br_4Na_2O_5$; CAS No. 17372-87-1), un tinte de contraste común con hematoxilina de alumbre en el método de Hematoxilina y Eosina (H & E). La Eosina Y absorbe una estrecha banda de luz, con un pico de absorción alrededor de 525 nm. Este pico de absorción corresponde, casi exactamente, con el pico de longitud de onda de emisión del LED verde 16G. La Figura 7 ilustra el espectro de absorción para Eosina Y superpuesto sobre los espectros de iluminación para los cuatro LED de color 16R, 16G, 16B, y 16Y (Figura 6). Obsérvese que para una muestra teñida con Eosina Y, la mayoría de la luz verde es bloqueada mientras que las longitudes de onda del azul, amarillo y rojo se transmiten.

Si una muestra biológica teñida con Eosina Y se ilumina con una fuente incandescente, la mayor parte de la luz verde se bloquea, y el espectro restante es percibido por el ojo humano como un color rosa claro. Sin embargo, si una muestra biológica teñida con Eosina Y se ilumina usando únicamente LED rojo, verde y azul 16R, 16G, 16B, la ausencia de las longitudes de onda del color amarillo provoca un cambio considerable en el color percibido de la muestra biológica. Al igual que con la fuente incandescente, la mayor parte de la luz verde se bloquea, y el resto de la mezcla de rojo y azul es percibida por el ojo humano como un tono muy saturado de color magenta. Por consiguiente, las agrupaciones gruesas de células teñidas con Eosina Y aparecen tan oscuras y saturadas que es difícil identificar los núcleos. Un patólogo o los tecnólogos en citologías observan por lo tanto una imagen muy diferente de lo que esperan observar bajo iluminación incandescente tradicional.

Percepciones de color similares pueden presentarse en muestras biológicas teñidas con colorante Anaranjado G (sal disódica del ácido 1-fenilazo-2-naftol-6,8-disulfónico; $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$, CAS No. 1936-15-8). Si se utiliza un sistema de iluminación con base en LED que tiene únicamente LED rojo, azul, y verde para iluminar una muestra biológica para su visualización, es difícil distinguir la coloración del Anaranjado G de Eosina Y. Esto es problemático, sin embargo, debido a que la coloración con Anaranjado G se un indicador de cáncer queratinizante. Existe por tanto la posibilidad de un diagnóstico erróneo de los sistemas de iluminación que sólo se basan en colores RGB.

Debido a que la tinción de células proporciona información de diagnóstico, es imperativo que las estructuras biológicas iluminados por LED (por ejemplo, células y orgánulos celulares) aparezcan igual que aquellos iluminados con fuentes de luz incandescentes utilizados típicamente en los microscopios. Si se utilizaran solo LED RGB para iluminar las células, es posible que una muestra puede ser diagnosticada en forma errónea por un patólogo o tecnólogo en citologías debido a las diferencias en apariencia.

Este problema se resuelve, sin embargo, si se añade un LED amarillo 16Y y se ajustan las intensidades relativas de los LED 16R, 16G, 16B, 16Y de modo que la luz todavía aparece blanca. En consecuencia, una muestra teñida con Eosina Y se percibe o visualiza con el tono rosáceo esperado en vez del color magenta oscuro. Al igual que con la fuente de luz incandescente, la mayor parte de la luz verde del LED 16G es bloqueada, y la mezcla restante de luz roja, azul y amarilla es percibida por el ojo humano como un color rosa claro. El matiz percibido se puede ajustar mediante la variación del brillo de la luz amarilla para que coincida con la apariencia de la iluminación incandescente. Por ejemplo, con referencia a la Figura 3, se puede usar el circuito controlador del LED 40Y para

alterar el brillo del LED amarillo 16Y mediante el ajuste de la modulación del ancho del pulso.

- 5 La iluminación blanca mejorada se puede lograr mediante la construcción de un módulo de LED 42 que incorpore uno o más LED amarillos 16Y además de uno o más de los LED convencionales rojo, verde y azul 16R, 16G, 16B. Alternativamente, se pueden combinar múltiples módulos LED 42 para imitar una fuente de luz incandescente de banda ancha. Aunque la invención descrita en la presente memoria ha sido descrita usando cuatro colores de LED (rojo, verde, azul, y amarillo), se podrían lograr resultados similares por medio de cualquier combinación de colores de LED que cubra una porción suficiente del espectro visible. Por ejemplo, una combinación de LED violeta, azul, amarillo-verde, y anaranjado proporcionaría un espectro tan completo como aquel creado por los LED rojo, verde, azul, y amarillo.
- 10 La inclusión de colores adicionales de LED en un sistema de iluminación 10 del tipo descrito en este documento puede ser capaz de proporcionar un espectro más completo, que emule el espectro emitido a partir de la radiación incandescente.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de iluminación de microscopio (10) que comprende:

- 5 una fuente de luz que comprende al menos un LED rojo (16R) configurado para emitir luz en el rango de 625 nm a 660 nm, al menos un LED verde (16G) configurado para emitir luz en el rango de 480 nm a 575 nm, al menos un LED azul (16B) configurado para emitir luz en el rango de 450 nm hasta aproximadamente 500 nm , y una pluralidad de LED de color amarillo (16Y) que rodea al menos un LED rojo (16R), y al menos un LED verde (16G), por lo menos un LED azul (16B), la pluralidad de LED amarillos (16Y) configurada para emitir luz en el rango de 575 nm a 625 nm;
- 10 un soporte de muestra dispuesto dentro del camino óptico de la fuente de luz, el soporte de muestra configurado para mantener un portaobjetos de microscopio (14) que contiene una muestra biológica (12);
- una cámara (22) configurada para capturar y aumentar una imagen de la muestra biológica (12);
- un circuito controlador de pulsos del LED (20) configurado para controlar simultáneamente al menos un LED rojo (16R), al menos un LED verde (16G), al menos un LED azul (16B) y la pluralidad de LED de color amarillo (16Y) , de tal manera que los LED (16R, 16G, 16B, 16Y) se encienden al mismo tiempo, y
- 15 un disparador externo (26) configurado para activar el circuito de control de pulsos del LED (20) para suministrar pulsos cortos intensos de luz a la cámara (22) durante la un periodo de integración de la cámara.
2. El sistema de iluminación del microscopio (10) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un LED rojo (16R), al menos un LED verde (16G), al menos un LED azul (16B), y la pluralidad de LED amarillos (16Y) están montados sobre un sustrato común.
- 20 3. El sistema de iluminación del microscopio (10) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un circuito de control (40Y) para modificar el brillo de la pluralidad de LED de color amarillo con respecto a al menos un LED rojo (16R), a al menos un LED verde (16G), y a al menos un LED azul (16B) .
- 25 4. El sistema de iluminación del microscopio (10) de la reivindicación 1, en el que al menos un LED rojo (16R), al menos un LED verde (16G), al menos un LED azul (16B), y la pluralidad de LED amarillos (16Y) están acoplados con circuitos controladores separados (40R, 40G, 40B, 40Y) para ajustar el brillo respectivo de cada color.
5. El sistema de iluminación del microscopio (10) de la reivindicación 1, en el que el disparador externo (26) comprende un generador de onda cuadrada.

FIG. 1

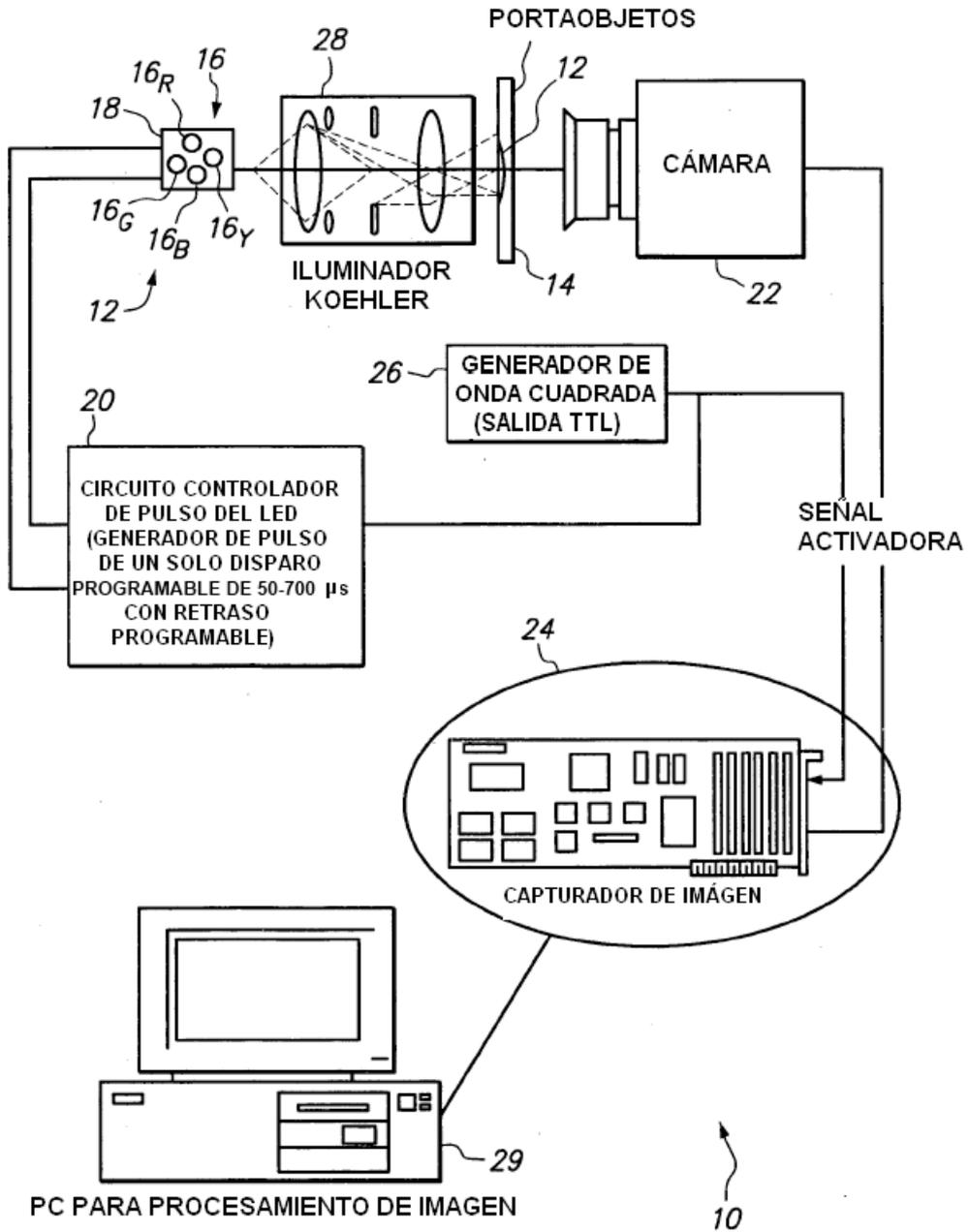


FIG. 2

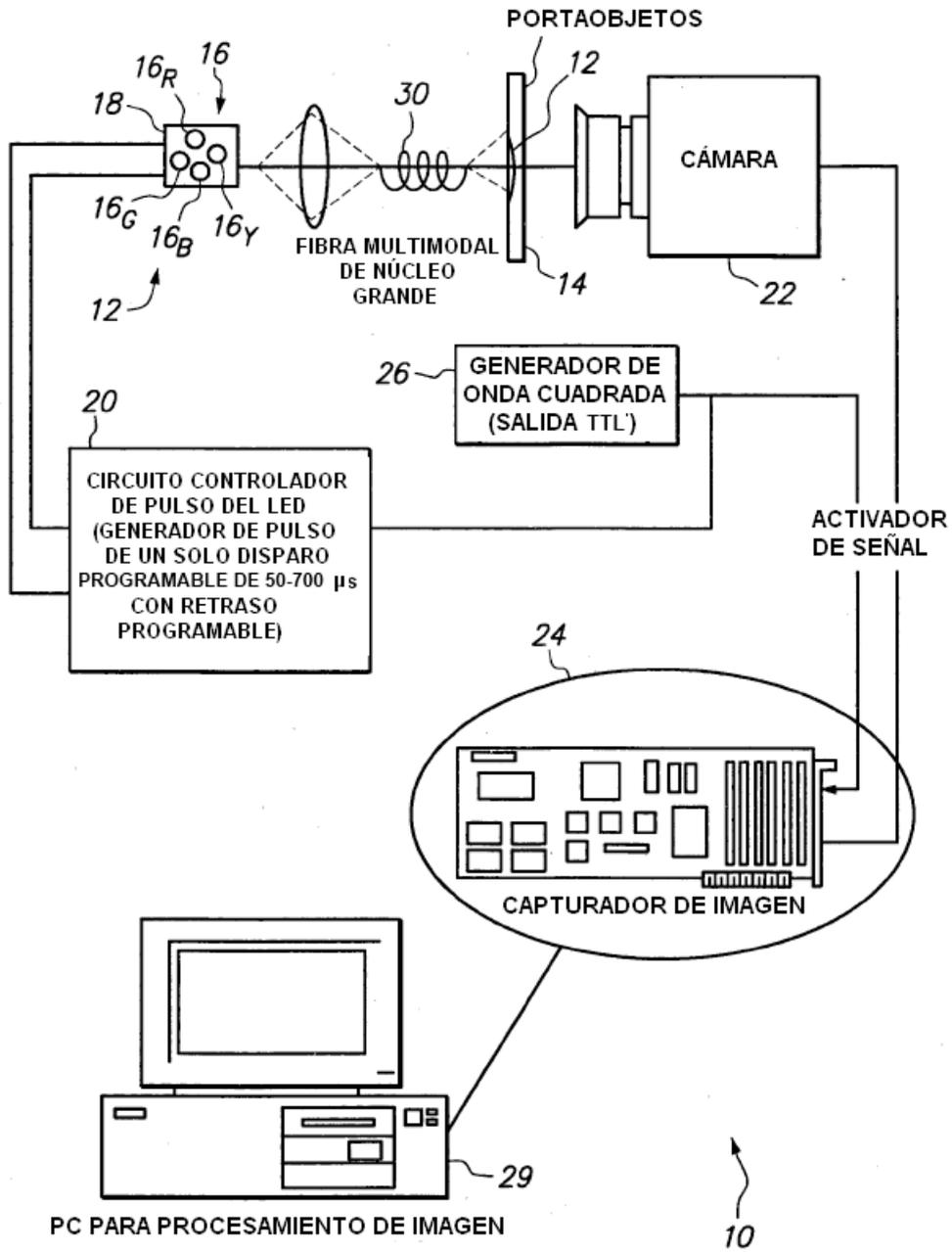


FIG. 3

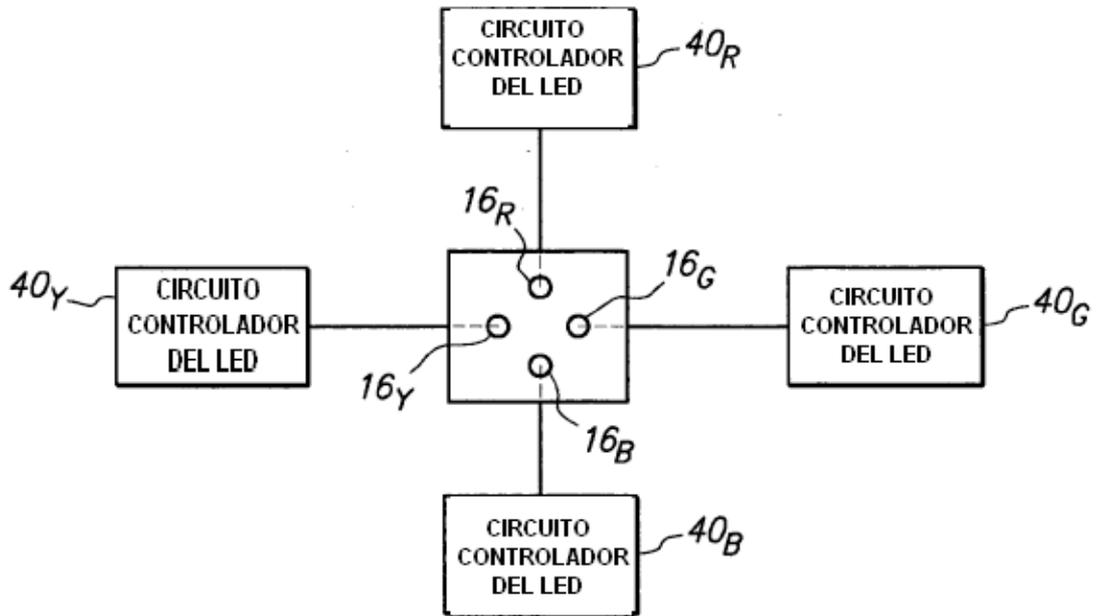


FIG. 4

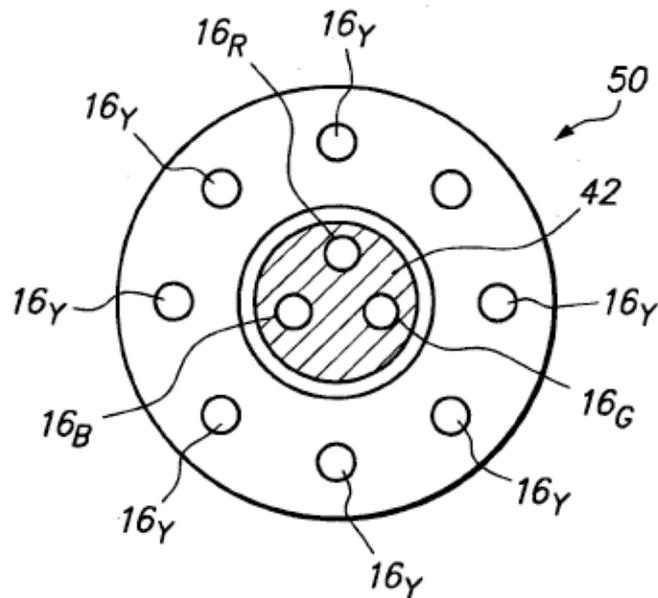


FIG. 5

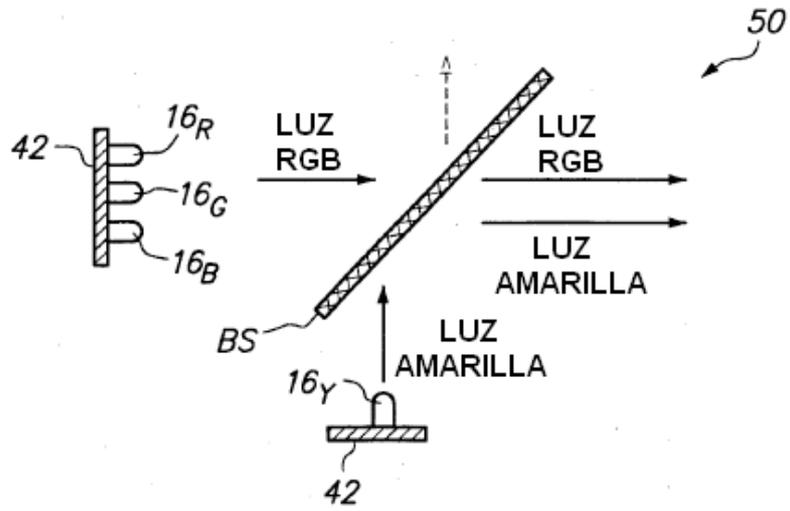


FIG. 6

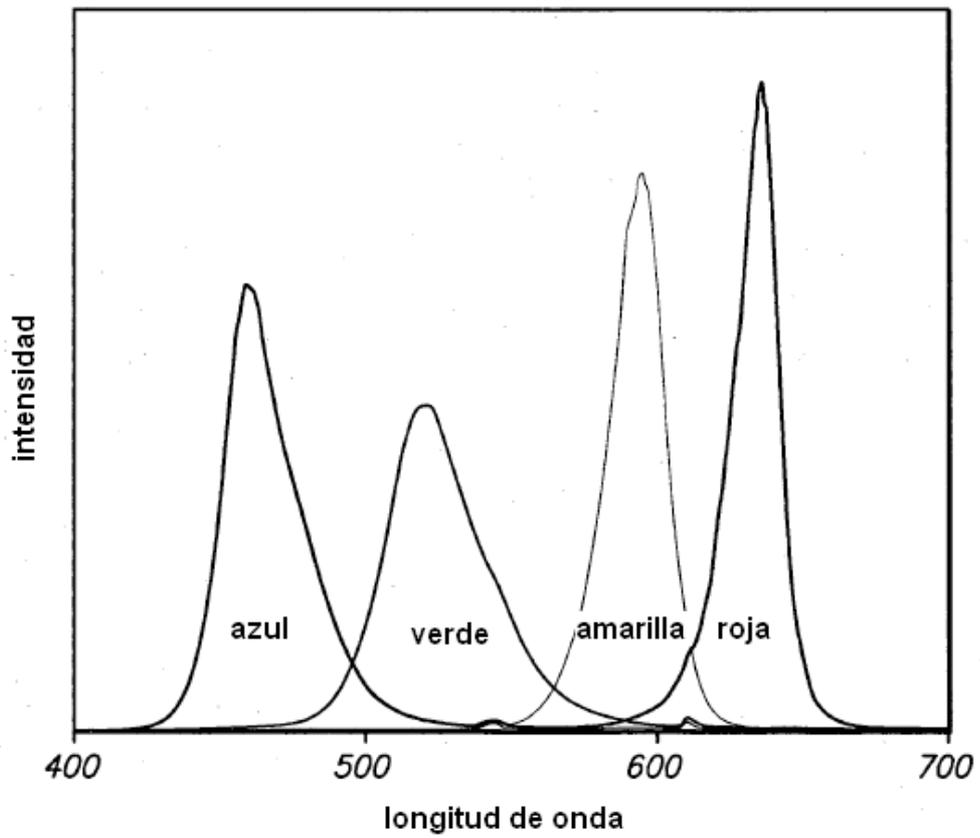


FIG. 7

