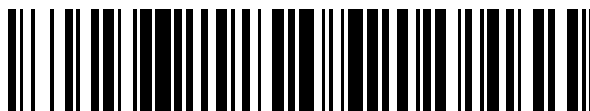


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 872**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 21/16 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08760262 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2150805**

54 Título: **Tratamiento de imágenes por fluorescencia, programa de ordenador, producto de programa de ordenador y sistema de tratamiento de imágenes por fluorescencia**

30 Prioridad:

01.06.2007 EP 07109459

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

13.03.2014

73 Titular/es:

**THE EUROPEAN UNION, REPRESENTED BY THE
EUROPEAN COMMISSION (100.0%)
RUE DE LA LOI, 200
1049 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:

**BEDNARKIEWICZ, ARTUR y
WHELAN, MAURICE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 447 872 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

Tratamiento de imágenes por fluorescencia, programa de ordenador, producto de programa de ordenador y sistema de tratamiento de imágenes por fluorescencia.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general al tratamiento de imágenes por fluorescencia, y trata más particularmente sobre el tratamiento de imágenes de muestras biológicas por espectros o tiempos de vida de fluorescencia.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 El tratamiento de imágenes por fluorescencia es una potente técnica para el análisis de muestras biológicas. En el caso más sencillo, se usa un sistema de tratamiento de imágenes, tal como un microscopio de epifluorescencia equipado con una lámpara de excitación y un cubo de filtros, para iluminar la muestra con una longitud de onda mientras se forma su imagen con otra.

20 No obstante, se puede obtener considerablemente más información de la misma muestra si se utilizan las técnicas más avanzadas de Formación de Imágenes Hiperespectrales (HSI) o Formación de Imágenes por Tiempos de Vida de Fluorescencia (FLIM). En una configuración HSI se adquiere el espectro completo de fluorescencia para cada punto del objeto. Es un método particularmente útil para discriminar claramente diferentes características estructurales dentro de una muestra cuando se utilizan múltiples colorantes fluorescentes cuyos espectros se solapan (*T. Zimmermann, "Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy", Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 95, 245-265 (2005)*). En lugar de medir la intensidad (espectral), el FLIM implica el establecimiento de correspondencias de los tiempos de decaimiento de fluorescencia (*J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy (Kluwer Academics, 1999)*), que pueden variar en función del entorno local de fluoróforos exógenos o endógenos. Un enfoque tan funcional del tratamiento de imágenes resulta muy adecuado para el estudio de procesos bioquímicos y biofísicos en tejidos y células, frecuentemente de una manera no destructiva (*D.Elson, J.Requejo-Isidro, I.Munro et al. "Time domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue" Photochem.Photobiol.Sci. 3, 795-801 (2004)*).

35 El tratamiento de imágenes espectrales de campo amplio se lleva a cabo habitualmente usando un conjunto de filtros ópticos de emisión montados en un soporte de rueda de filtros o de cubo de filtros rotatorio. Este planteamiento es directo y relativamente económico, aunque habitualmente es bastante lento y engorroso debido a la conmutación mecánica de los filtros. De forma típica solamente se puede adquirir un número limitado de bandas espectrales, lo cual permite una separación solamente parcial de los espectros de fluorescencia solapados. Los sistemas HSI más versátiles utilizan dispositivos electro-ópticos tales como Filtros Sintonizables de Cristal Líquido (LCTF), Filtros Dieléctricos Pasabanda Linealmente Variables (LVDF) o Filtros Sintonizables Acústico-Ópticos (AOTF) (*M.Bouhifd, M.P.Whelan, M.Aprahamian, "Fluorescence imaging spectroscopy utilizing acousto-optic tuneable filter", 5826A-23 (OptoIreland, 2005)*). La solución de LCTF ofrece aproximadamente el 30% de la eficiencia de transmisión pasabanda, lo cual con frecuencia es inaceptable para aplicaciones con bajo nivel de luz. La resolución de los LVDF es aproximadamente 15 nm, su banda espectral cubre entre 400 y 700 nm, y su eficiencia de transmisión está en torno al 40%. Aunque estos parámetros son suficientemente buenos para el tratamiento estático de imágenes, el uso de un LCTF para HSI con el fin de estudiar el comportamiento dinámico en condiciones de bajo nivel de luz puede resultar problemático. El AOTF es un filtro óptico de ancho de banda variable, controlable de forma electrónica, que proporciona una versatilidad y un rendimiento significativos en comparación con otros filtros sintonizables. Soporta el acceso aleatorio a cualquier banda de transmisión o la sintonización espectral continua y, por lo tanto, resulta muy adecuado para el HSI cuando se combina con una cámara sensible. No obstante, todos estos sistemas de HSI de campo amplio basados en filtros sintonizables pueden padecer una calidad de imagen relativamente deficiente debido a la dispersión presente en la mayoría de muestras biológicas. Esto puede dar como resultado una reducción del contraste de la imagen y la pérdida de información cuantitativa, tal como la concentración de un fluoróforo.

55 Como alternativa, la reconstrucción de un mapa de fluorescencia realizando mediciones punto a punto ha demostrado entregar imágenes de calidad superior (*B.W. Pogue, S.L. Gibbs, B. Chen, M. Savellano, "Fluorescence Imaging in Vivo: Raster Scanned Point Source Imaging Provides More accurate Quantification than Broad Beam Geometries" Technology in Cancer Research and Treatment 3, 15-21 (2004)*), que revelan de forma más precisa la localización y concentración de marcadores fluorescentes. No obstante, debido a que este planteamiento requiere habitualmente una exploración de trama llevada a cabo por medio de sistemas electro-mecánicos complejos, el mismo resulta difícil y costoso de implementar.

65 En general, se puede realizar una aproximación al tratamiento de imágenes por tiempos de vida de fluorescencia en el dominio del tiempo de dos maneras, a saber, el tratamiento de imágenes por tiempos de vida de fluorescencia de campo amplio o la exploración de trama punto a punto. Los sistemas de tratamiento de imágenes de campo amplio (o haz ancho) utilizan una cámara con Intensificador Óptico Controlado por Compuerta (*Gated and Optical*

Intensified (GOI)) en combinación con un láser pulsado de alta potencia. Típicamente, se irradia luz de excitación sobre el área a detectar y se captura la fluorescencia del área, toda de una vez, por medio de un sensor de matriz CCD para obtener así información de fluorescencia de una región bidimensional. Un sistema FLIM de este tipo es rápido (*J.Requejo-Isidro, J.McGinty, I.Munro, D.S. Elson et al. "High-speed wide-field time-gated endoscopic fluorescence-lifetime imaging", Optics Letters 29, 2249-2251 (2004)*) aunque demuestra una resolución temporal y espacial menor en comparación con mediciones de exploración. El coste elevado y la falta de portabilidad son también problemas que han limitado su aceptación. Por otro lado, la revelación exitosa del FLIM basado en GOI que usa diodos láser de picosegundos ha sido de cierta ayuda (*D.S.Elson et al., "Fluorescence lifetime system for microscopy and multiwell plate imaging with blue picosecond diode laser", Optics Letter 12, 1409-1411 (2002)*).

Todavía con respecto al tratamiento de imágenes de campo amplio, puesto que la información de fluorescencia del área tomada de la imagen se detecta como un todo al mismo tiempo, pueden aparecer problemas de imágenes borrosas debido a la dispersión de la luz. De hecho, puesto que el área de captación de la imagen se ilumina como un todo por medio de una fuente de luz, la detección y separación de la fluorescencia débil resulta difícil cuando hay múltiples puntos de fluorescencia en torno al punto débil, ya que la luz de fluorescencia se dispersa por todo el área vecina, lo cual hace que aumente al ruido de fondo y que se solape la fluorescencia a medir. Para evitar estos problemas, se han desarrollado dispositivos generadores de patrones de luz de excitación que permiten irradiar diferentes intensidades y ubicaciones sobre una muestra de forma secuencial con una frecuencia de cuadro relativamente alta. Por ejemplo, en el documento US 2006/0226375 se describe un aparato de detección de fluorescencia que usa un dispositivo generador de patrones de luz de excitación de este tipo, basado en un dispositivo digital de microespejos (DMD) o un dispositivo de cristal líquido de tipo reflectante.

El segundo planteamiento (del tipo exploración) para el FLIM en el dominio del tiempo saca provecho del método de Espectroscopia de Fotones Individuales con Correlación en el Tiempo (TCSPS) combinado con la exploración punto a punto (*Y.Zhang, S.A.Soper, L.R. Middendorf, J.A. Wurn, R.Erdmann, M.Wahl, "Simple Near-Infrared Time-Correlated Single Photon Counting Instrument with a Pulsed Diode Laser and Avalanche Photodiode for Time-Resolved Measurements in Scanning Applications", Applied Spectroscopy 53, 497-504 (1999)*) o el barrido confocal de láser (*M.Kress, T.Meier, R.Steiner, F.Dolp, R.Erdmann, U.Ortmann, A.Rück, "Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes", Journal of Biomedical Optics 8, 26-32 (2003)*). Típicamente, un haz de luz puntual correspondiente a la luz de excitación irradia la muestra de manera que la fluorescencia del punto irradiado es detectada, por ejemplo, por un Tubo Fotomultiplicador (PMT), y esta exploración de irradiación y detección por todo el objeto a observar permite obtener información de fluorescencia de un área bidimensional. Los diodos láser de picosegundos constituyen la fuente de excitación más popular debido a su compacidad y su coste razonable, mientras que, para detectar los fotones de fluorescencia emitidos, se puede usar un PMT o un Fotodiodo de Avalancha (APD). Con respecto al FLIM de campo amplio, la TCSPS con exploración es más directa y menos costosa de implementar. Ofrece también una mayor resolución temporal, aunque a costa de velocidades de imagen mucho más lentas. Para obtener imágenes de FLIM, o bien la muestra se mueve sobre una platina de traslación bajo el punto de la luz de excitación o bien la muestra se mantiene fija mientras se lleva a cabo una exploración de trama del punto de excitación usando espejos galvánicos. Aunque existen varias soluciones comerciales atractivas basadas en los dos métodos de exploración, las desventajas de la exploración por puntos son en general su baja velocidad de formación de imágenes y la falta de flexibilidad en cómo se forma una imagen. Normalmente, se requiere un tiempo de muestreo mínimo de 100 μ s por punto de medición (píxel), lo cual conduce a una duración de varios segundos a decenas de minutos para adquirir una imagen completa. La duración concreta depende de varios factores que incluyen la intensidad de la señal de fluorescencia y el campo de visión deseado, y la resolución temporal y espacial. La mayoría de sistemas de exploración son de carácter analógico y por lo tanto no ofrecen ni el acceso aleatorio a cualquier punto o región de interés de la muestra, ni la posibilidad de agrupar o combinar los fotones emitidos desde diferentes posiciones.

Evidentemente, una cuestión importante en el tratamiento de imágenes FLIM/HIS es también la precisión del análisis de datos. Para reducir el tiempo de adquisición y la reconstrucción de cuadros de imagen completos, el tiempo de adquisición de datos por cada píxel individual típicamente se reduce, lo cual a su vez hace que disminuya la relación señal/ruido y reduce además la precisión y la fiabilidad del procesado de datos. Por el carácter extremo o complejo de los fenómenos observados, el propio análisis de datos es también complejo y consume mucho tiempo. A saber, para ajustar parámetros fenomenológicos en el modelo foto-físico con el fin de llegar a un acuerdo satisfactorio entre el conjunto de datos experimental y el modelo, es necesario llevar a cabo un ajuste iterativo de datos. Para mantener la alta resolución espectral/temporal de las mediciones, se producen grandes conjuntos de datos/píxeles, y es necesario analizar un número elevado de píxeles para reconstruir la imagen de FLIM/HIS. De este modo, el algoritmo de ajuste consume muchísimo tiempo. Se han propuesto varios métodos para reducir el tiempo de cálculo, los cuales se basan en el denominado "Enfoque de Análisis Global". Lo más común es que a las señales de fluorescencia de todos los píxeles se les aplique un post-procesado sumándolas todas entre sí para incrementar la relación S/N. A continuación, el resultado, es decir, los parámetros fenomenológicos del modelo, se usan como parámetros iniciales para el algoritmo de análisis de datos que se lleva a cabo fuera de línea (es decir, después de la adquisición de datos de fluorescencia) para cada una de las posiciones espaciales en la muestra. Las modificaciones del Análisis Global incluyen la suma de conjuntos de datos de cuartos de la imagen o de regiones seleccionadas manualmente sobre la base de la imagen anatómica de luz blanca de la muestra [*S.Pelet, M.J.R.*].

Previte, L.H.Laiho, P.T.C.So, "A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation", *Biophysical Journal*, vol. 87, 2807-2817 (2004)]. No obstante, estos métodos padecen o bien la pérdida de detalles (señal débil y su impacto en la fluorescencia total es débil) o bien la necesidad de una gran experiencia en el marcaje manual de las regiones deseadas de interés, y su uso se limita a casos específicos. Por otra parte, el análisis de datos se lleva a cabo fuera de línea, habiéndose adquirido antes el conjunto de datos por cada píxel.

El documento JP 2006 171024 A describe un método de espectrofotometría de fluorescencia multi-punto que hace uso de un DMD, en donde una muestra se ilumina para excitar su fluorescencia, y se adquiere una imagen de la misma; la segmentación de la imagen se basa en la existencia de fluorescencia (por ejemplo, usando un umbral de luminancia); y la fluorescencia de cada Región de Interés se adquiere de una en una.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método alternativo de tratamiento de imágenes por fluorescencia.

Descripción general de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, un método de tratamiento de imágenes por fluorescencia comprende las etapas siguientes:

- a) iluminar una muestra para excitar su fluorescencia y adquirir una imagen de la misma;
- b) basándose en la información espacial y espectral de fluorescencia de la imagen de fluorescencia de la muestra, segmentar la imagen en regiones de propiedades espectrales similares;
- c) para cada segmento de imagen, excitar la fluorescencia de la región de muestra correspondiente, y detectar la fluorescencia correspondiente;
- d) basándose en un modelado, determinar parámetros de fluorescencia esperados a partir de las señales de fluorescencia detectadas para cada región;
- e) explorar la muestra y determinar parámetros de fluorescencia finales sobre la base de dichos parámetros de fluorescencia esperados.

Así, el presente método propone un método de tratamiento de imágenes por fluorescencia y con exploración (de trama (*raster*)), que comprende una etapa preliminar de adquisición y análisis de imágenes por fluorescencia, con el fin de discriminar diferentes regiones de muestra estructurales y funcionales, antes de proceder con la exploración de la muestra en sí. Este método resulta particularmente muy adecuado para el tratamiento de imágenes de FLIM o HSI. La discriminación se lleva a cabo mediante la denominada "segmentación" de la imagen de fluorescencia, respectivamente de la muestra, basándose en información espacial y espectral de fluorescencia que se puede obtener con cualquier método de tratamiento de imágenes con resolución espectral. A continuación, se determinan parámetros iniciales buenos entrenados, es decir, los parámetros de fluorescencia esperados, para cada región (segmento) usando modelos matemáticos, y estos parámetros iniciales buenos se usarán posteriormente para determinar los parámetros de fluorescencia finales de las señales de fluorescencia adquiridas durante la etapa e) de exploración de trama. Típicamente, los parámetros de fluorescencia finales a determinar tras la exploración de trama se pueden determinar por medio de un algoritmo de ajuste que use los parámetros de fluorescencia esperados como parámetros iniciales.

Mediante esta etapa de segmentación, se puede proporcionar información *a priori* que acelerará los algoritmos de ajuste utilizados tradicionalmente para determinar parámetros de fluorescencia mediante exploración de trama. De hecho, tal como es bien sabido en la técnica, el proceso de análisis de imágenes de FLIM o HSI se lleva a cabo habitualmente mediante ajuste iterativo de los datos experimentales con modelos matemáticos. La segmentación de la imagen y la provisión de parámetros de fluorescencia esperados permite disponer de parámetros iniciales buenos para los algoritmos de ajuste de decaimiento (para FLIM) o de espectros (para HSI) que se usan con el fin de determinar los parámetros de las señales de fluorescencia adquiridas durante la exploración de trama.

De este modo, el presente método difiere significativamente con respecto al FLIM de exploración convencional en el que el análisis de datos se lleva a cabo fuera de línea sin ninguna información *a priori*, y por lo tanto usando parámetros iniciales aleatorios en los algoritmos de ajuste. Por otra parte, el método propuesto suministra Parámetros Iniciales Buenos para un análisis adicional de datos más rápido y más preciso basado en información obtenida a partir de regiones foto-físicamente similares, a lo cual se le podría denominar Análisis Local, por oposición a los algoritmos de Análisis Global que promedian la señal de fluorescencia y pierden detalles.

Todavía con respecto a la segmentación, adicionalmente se pueden tener en cuenta las intensidades de

fluorescencia detectadas además de sus espectros de fluorescencia para determinar las regiones de muestras similares. Este procedimiento de segmentación debe diferenciarse con respecto a la adquisición y el procesado de imágenes bajo luz blanca, donde no se invoca la fluorescencia de la muestra para clasificar diferentes regiones anatómicas.

5 La etapa de exploración e) implica la exploración de un punto de luz de excitación sobre la muestra y la detección de señales de fluorescencia (decaimiento de fluorescencia o espectro de la fluorescencia) usando equipos específicos. Para el tratamiento de imágenes FLIM, la fluorescencia se puede detectar por medio de un fotomultiplicador, un fotodiodo o similar, que permita la recodificación del perfil temporal de intensidades de fluorescencia mediante cualquier método (por ejemplo, TCSPS, intensidad de fluorescencia con respecto a tiempo, etcétera). Para el HSI, la detección de fluorescencia se lleva a cabo por medio de un detector espectralmente selectivo basado en cualquier tecnología (por ejemplo, espectrofotómetro, conjunto de fotodiodos/fotomultiplicadores con capacidad de resolución espectral, etcétera), para registrar las intensidades de fluorescencia a longitudes de onda diferentes.

15 Preferentemente, el dispositivo generador de patrones de luz de excitación comprende un dispositivo digital de microespejos (DMD). Dicho iluminador espacial es compacto y no comprende ninguna pieza en movimiento macromecánica. El DMD se puede controlar fácilmente para reflejar luz de excitación en cualquier área (región) 2D de la muestra con el fin de llevar a cabo el análisis de fluorescencia localizado de la etapa c). Adicionalmente, el DMD se puede controlar ventajosamente para generar un punto de luz de excitación en movimiento con el fin de llevar a cabo la exploración de trama de la luz de excitación en la etapa e), que es un tipo de patrón de iluminación. Aunque se prefiere un DMD por su facilidad de control, sus costes y su fiabilidad, se pueden usar otros iluminadores espaciales, por ejemplo, matrices de Transmisión o Reflexión de Cristal Líquido. Las etapas c) y e) incluso se pueden llevar a cabo con dispositivos diferentes.

25 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, un método de tratamiento de imágenes por fluorescencia comprende las etapas siguientes:

- a) iluminar una muestra para excitar su fluorescencia y adquirir una imagen de la misma;
- 30 b) basándose en la información espacial y espectral de fluorescencia de la imagen de fluorescencia de la muestra, segmentar la imagen en regiones de propiedades espectrales similares;
- c) para cada segmento de imagen, excitar la fluorescencia de la región de muestra correspondiente, y detectar la fluorescencia correspondiente;
- 35 d) basándose en un modelado, determinar parámetros de fluorescencia a partir de las señales de fluorescencia detectadas para cada región;
- e) construir imágenes por tiempos de vida de fluorescencia o espectros de fluorescencia que proporcionen un mapa de los parámetros de fluorescencia correspondientes a dichos parámetros de fluorescencia de la etapa d.
- 40

Las primeras etapas a) a d) de este método son idénticas a las descritas para el primer método, aunque no se produce ninguna exploración de trama. De hecho, los presentes inventores han observado que, en algunas circunstancias, basta con un mapa (imagen) de imagen de fluorescencia construido con información de fluorescencia obtenida en la etapa d). Esto se puede realizar para el tiempo de vida aunque también para parámetros de fluorescencia espectrales.

50 En el caso del tratamiento de imágenes por tiempos de vida de fluorescencia, a la presente invención se le puede denominar tratamiento de imágenes por tiempos de vida de fluorescencia con segmentación o "SFLIM". En comparación con el FLIM de tipo de exploración tradicional, evidentemente no es tan preciso aunque muchísimo más rápido. En el caso del tratamiento de imágenes por espectros de fluorescencia, a la presente invención se le puede denominar tratamiento de imágenes hiperespectrales por fluorescencia con segmentación o "SHSI". En comparación con el HSI de tipo exploración tradicional, evidentemente no es tan preciso aunque muchísimo más rápido.

Se apreciará que en los dos métodos, la segmentación de la imagen se basa en las propiedades espectrales de fluorescencia de la muestra. Además de la discriminación espectral se puede usar la intensidad. En una forma de realización, las propiedades espectrales de la muestra se codifican como color (Tono) de los píxeles del dispositivo de imágenes. En el caso de una cámara CCD de color, la composición de, por ejemplo, los componentes RGB dentro de un píxel individual proporciona información suficiente para diferenciar, por ejemplo, entre regiones más verdes con respecto a las más azules. Tal como se pondrá de manifiesto para aquellos expertos en la materia, para la segmentación se pueden usar diversos métodos de adquisición de imágenes en color, siempre que proporcionen información espectral con resolución espacial con el fin de diferenciar entre regiones que presenten propiedades fotofísicas similares; los píxeles de imágenes típicamente útiles se pueden codificar en forma de intensidad en una banda espectral dada.

Tal como se ha entendido, los presentes métodos de la invención son particularmente útiles para el FLIM, una técnica (usada principalmente en biología) de establecimiento de correspondencias del tiempo de vida de fluorescencia de cromóforos (endógenos como, por ejemplo, las porfirinas, las proteínas, el colágeno, etcétera, o exógenos como, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, colorantes de tinción) situados dentro de células vivas/teñidas. El tratamiento de imágenes FLIM implica una gran cantidad de cálculo, puesto que se debería medir el tiempo de vida de fluorescencia (descrito por el decaimiento (multi)exponencial) para cada píxel individual, y el mismo se debería convertir en una constante de decaimiento ajustando el decaimiento experimental al modelo.

El presente método encuentra también aplicación particular en el tratamiento de imágenes HSI, una técnica (usada en biología, medicina, formación de imágenes por satélite con fines agrícolas) de captación de las imágenes dentro de diferentes regiones espectrales (UV-Vis-IR). El caso más sencillo consiste en el uso de un filtro de color de vidrio para adquirir una imagen de intensidad para cromóforos que emiten, por ejemplo, en rojo por oposición a la totalidad del resto de emisores presentes en el objeto. La solución más sofisticada implica la medición del espectro de fluorescencia total (por ejemplo, perfil de intensidad con respecto a longitud de onda de emisión) para cada píxel individual. Para analizar las imágenes de HSI de manera fiable (de una manera cuantitativa, por ejemplo, midiendo la relación de concentración de los dos cromóforos que presentan diferentes características espectrales), se requiere una gran cantidad de cálculo, puesto que es necesario aplicar una deconvolución en los espectros experimentales - descomposición en los espectros de cada cromóforo disponible en la muestra. El tratamiento de imágenes HSI y la descomposición del espectro de fluorescencia total resultan especialmente útiles cuando varios fluoróforos que presentan espectros de fluorescencia diferentes, aunque solapados, están presentes dentro de la misma posición espacial (píxel).

Los presentes métodos resultarán ser mucho más rápidos y más precisos que los planteamientos convencionales de estas técnicas de FLIM y HSI, donde típicamente no existe una información *a priori* antes de la exploración de trama.

Tal como se entenderá, el método de la invención se implementará típicamente en un aparato óptico controlado por ordenador. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a un programa de ordenador y a un producto de programa de ordenador que comprende unos medios de código de programa de ordenador (posiblemente en un soporte legible por ordenador) adaptados para llevar a cabo los métodos anteriores.

Según otro aspecto de la presente invención, se propone un sistema de tratamiento de imágenes por fluorescencia, para analizar una muestra, y dispuesto para llevar a cabo los métodos anteriores, que comprende:

- una fuente de luz de excitación;
- un dispositivo generador de patrones de luz de excitación iluminado por dicha fuente de luz de excitación y con capacidad de producir patrones de luz sobre una muestra a analizar;
- un dispositivo de tratamiento de imágenes que produce imágenes de fluorescencia de campo completo con información espectral;
- un fotodetector para detectar fluorescencia de campo completo emitida por la muestra;
- unos medios de control programables para controlar dicho dispositivo generador de patrones de luz de excitación y adquirir datos experimentales a partir de dicho dispositivo de tratamiento de imágenes y dicho fotodetector.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se clarificará adicionalmente a partir de la siguiente descripción de varias formas de realización no limitativas, en referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

la figura 1: es un boceto de la disposición óptica de laboratorio para implementar los presentes métodos de tratamiento de imágenes por fluorescencia;

la figura 2: es un dibujo fundamental que ilustra las etapas principales del presente método;

la figura 3: es una representación esquemática de la etapa de segmentación del algoritmo de tratamiento de imágenes FLIM con Análisis Local. Basándose en la imagen con fluorescencia de color $I(x,y)$ y en la segmentación adicional del Histograma de Tonos, se crean máscaras binarias B_r y las mismas se envían sucesivamente al proyector de DMD. Se recogen simultáneamente decaimientos experimentales D_r para cada patrón binario proyectado sobre la muestra. Después del análisis, es decir, ajuste (Ajuste) del decaimiento experimental D_r con parámetros iniciales P , se crea una tabla de referencia $T_r = \{A^r, \tau_1^r, \tau_2^r\} = \text{Ajuste}(D_r, P)$. Simultáneamente, se crea un mapa de referencia $S_{x,y} = r$, donde todos los píxeles pertenecientes a la máscara

binaria B_r obtienen el mismo número (r), que remite a la tabla de referencia T_r . De este modo, para cada píxel (x,y) se pueden obtener fácilmente parámetros de fluorescencia estimados, por ejemplo, $\tau_{x,y}=T_{S(x,y)}^r$;

la figura 4: es una representación esquemática de la etapa de tratamiento de imágenes del algoritmo de tratamiento de imágenes FLIM con Análisis Local. Cada píxel de la imagen remite a la tabla de referencia T_r (véase la figura 3) por el valor $S(x,y)$. Una forma de análisis de datos es el tratamiento de imágenes FLIM con Segmentación, en donde los píxeles de la imagen FLIM $F(x,y)$ adoptan sus valores directamente de la tabla T_r , $F(x,y)=T_{S(x,y)}$. El otro planteamiento de análisis (FLIM con exploración de trama) trata los valores de $T_{S(x,y)}$ como Parámetros Iniciales Buenos para una exploración de trama adicional $F(x,y)=\text{Ajuste}(D,T_{S(x,y)})$ llevada a cabo para cada píxel.

Descripción detallada de formas de realización preferidas

A continuación se describirá más detalladamente una forma de realización preferida del presente método, según se aplica al FLIM de exploración de trama con adquisición y análisis previos de imágenes por fluorescencia, con el fin de discriminar regiones de muestra estructurales y funcionales diferentes. La discriminación se lleva a cabo mediante segmentación de una imagen de fluorescencia de campo amplio (muestra completa) sobre la base de información espacial y espectral de fluorescencia obtenida con cualquier método de tratamiento de imágenes con resolución espectral. El objetivo del método es suministrar a los algoritmos de ajuste de decaimientos de fluorescencia (en el caso del FLIM) o a los algoritmos de ajuste de espectros de fluorescencia (en el caso del HSI) Parámetros Iniciales Buenos entrenados, para incrementar la precisión y la velocidad de la reconstrucción de imágenes FLIM/HSI.

En la figura 1 se ilustra una disposición experimental preferida para este método. La misma comprende, por ejemplo, un dispositivo de microscopio 10 en el cual la muestra a analizar se sustenta sobre una platina, una fuente de luz 14 que emite luz de excitación - por ejemplo, un diodo láser pulsado ($P_{\text{max}}=1\text{mW}$, $t_{\text{FWHM}}=50\text{ps}$, LDH 405) que trabaja con una velocidad de repetición de 40 MHz con un excitador de diodo láser pulsado PDL 800-B de PicoQuant GmbH - un dispositivo generador de patrones de luz de excitación 16, un sensor de imágenes 18 (por ejemplo, una matriz CDD de color), un fotodetector 20 y un ordenador 22. La luz emitida por la fuente de luz 14 es captada por el conjunto óptico de acondicionamiento 24 y cae sobre el dispositivo generador de patrones de luz de excitación 16, el cual de forma ventajosa está formado por un dispositivo digital de microespejos (DMD) con un conjunto electrónico de control apropiado (en este caso, un chip de DMD de 1.024×768 píxeles, 0,7 XGA, de Texas Instruments) controlable por medio del ordenador 22. Preferentemente, el conjunto óptico de acondicionamiento 24 incluye un expansor de haz y un prisma anamórfico para acondicionar el haz de luz de excitación y para iluminar homogéneamente el DMD 16. La referencia 26 indica un trayecto de iluminación que se extiende desde el DMD a la muestra 12. La luz reflejada por los espejos 16 del DMD, es decir, la imagen de DMD proyectada a través del conjunto óptico de acondicionamiento 28, es guiada a través del acceso de iluminación posterior del microscopio 10 y un cubo de filtros 30 hacia la superficie posterior de la muestra 12.

En la disposición de la figura 1, la fluorescencia de campo amplio es transmitida por un filtro dicróico pasoalto respectivo en el cubo de filtros 30 y reflejada por un espejo inclinable 31 o bien sobre el dispositivo de imágenes CCD 18 o bien sobre el tubo fotomultiplicador 20.

Se apreciará que el uso de un DMD como iluminador espacial no solamente permite producir patrones de excitación sino que también permite, cuando se programa apropiadamente, una exploración de punto a punto, de tipo trama. La exploración de trama se puede llevar a cabo de hecho conmutando secuencialmente un píxel individual (o agrupamiento rectangular de píxeles) del estado OFF al ON. En el estado ON, el grupo seleccionado de microespejos se desvía para reflejar la luz de excitación, a través del conjunto óptico y el cubo de filtros a la muestra. A continuación, la luz de excitación reflejada desde la totalidad del resto de micro-espejos (en el estado OFF) se atenúa y no provoca ninguna fluorescencia de la muestra. Durante la iluminación por puntos de la muestra, se registra el espectro de fluorescencia o el tiempo de vida de fluorescencia y el mismo se procesa preferentemente en línea en imágenes de FLIM según se describe posteriormente. Seguidamente, el(los) píxel(es) se conmuta(n) a OFF y el micro-espejo adyacente (o un grupo de microespejos) se cambia a ON para iluminar la región de muestra adyacente. Puesto que la señal de fluorescencia adquirida está en correlación con el píxel o grupo de píxeles de DMD por el punto de iluminación localizado espacialmente, píxeles respectivos de imágenes de reconstrucción se pueden rellenar con la información de fluorescencia procesada en línea.

El fundamento del presente método se puede entender rápidamente basándose en la figura 2. En primer lugar, se lleva a cabo ventajosamente una etapa de calibración para establecer una correlación entre el espécimen/muestra y el DMD 16, lo cual permite conocer de manera precisa las coordenadas de la muestra (en el dispositivo de imágenes) correspondientes a las del DMD 16, según se muestra en la figura 2a. De este modo, el resultado es una función de transferencia que proporciona la correspondencia entre coordenadas del espejo en el DMD y las coordenadas de los puntos de luz proyectada en la muestra.

A continuación, se ilumina la muestra completa (todos los espejos de la matriz de DMD ON, imagen b1 de la figura 2b) para excitar su fluorescencia, y se adquiere una vista previa de la imagen por medio del dispositivo de imágenes

CCD. Subsiguientemente, se lleva a cabo la segmentación de la imagen sobre la base de la información espacial y espectral obtenida a partir de la vista previa de la imagen, con el fin de determinar regiones de la muestra que presentan propiedades foto-químico-físicas similares. Es evidente que en este caso una región/segmento es típicamente una sub-área del área de muestra completa. En la vista previa de la imagen, un segmento constará típicamente de una pluralidad de píxeles vecinos en la imagen de fluorescencia de CCD b2 de la figura 2b). Por lo tanto, el término "segmento" designa una parte de la imagen con propiedades espectrales similares (típicamente, píxeles de un color o nivel de gris similar) que es menor que el área de imagen completa aunque mayor que una unidad de área (píxel) de la imagen. Y con "segmentación" se entiende la determinación de los segmentos sobre la base de información del espectro, opcionalmente con intensidades correspondientes.

Al producirse la identificación de los diferentes segmentos (o regiones de interés), las coordenadas de estas regiones se usan para construir las denominadas "máscaras" (mostradas en la figura 2c para facilitar su comprensión) que permitirán iluminar las correspondientes regiones de muestra. Por consiguiente, usando estas máscaras para controlar la posición respectiva de los espejos de DMD (ON u OFF), se iluminan selectivamente (normalmente una tras otra) las diferentes regiones de muestra con el DMD (patrón de máscara de DMD d1 en la figura 2d), y se detecta la fluorescencia correspondiente emitida por la región excitada (imagen d2). De hecho, debido a la función de transferencia determinada inicialmente (figura 2a), es posible iluminar de forma precisa una región de la muestra, de manera que únicamente se invoca la fluorescencia en esa región precisa. Para el tratamiento de imágenes FLIM, se usa un fotodetector con el fin de registrar la fluorescencia emitida con respecto al tiempo, mientras que para el tratamiento de imágenes HSI se usa un espectrofotómetro con el fin de registrar la intensidad de la fluorescencia con respecto a la longitud de onda. En esta etapa, la medida es una especie de valor medio sobre el área de muestra excitada, puesto que no proporciona información de fluorescencia con resolución espacial sino, simplemente, registros globales de la fluorescencia emitida por el área excitada.

Seguidamente (figura 2e), los datos experimentales adquiridos se ajustan con un modelo matemático para extraer parámetros clave (por ejemplo, constante de decaimiento, posición de los picos o anchura de la banda espectral, etcétera) como parámetro inicial bueno para el análisis posterior. Esto se realiza para cada segmento/región.

En el caso del FLIM, el ajuste se puede realizar, por ejemplo, con modelos exponenciales sencillos, en cuyo caso tiene interés Tau (constante de decaimiento), posiblemente con I_0 , I_{bk} . Para HSI, el ajuste se puede realizar por ejemplo con modelos Gaussianos, en donde la longitud de onda central y la anchura de banda espectral son parámetros interesantes. No obstante, existe una variedad de modelos y métodos fotofísicos susceptibles de ser usados para el análisis de datos.

A continuación, el DMD se controla por medio del ordenador para llevar a cabo una exploración de trama (figura 2f, imagen f1) de la muestra completa, y los parámetros iniciales buenos determinados previamente (figura 2e) se usan en el posterior procesado de datos correspondiente a los datos experimentales explorados por trama para determinar los parámetros de fluorescencia finales y precisos. Nuevamente, estos parámetros finales (en este caso parámetros de decaimiento I_0 , Tau e I_{bk}) para cada posición del dispositivo de imágenes se determinan mediante ajuste iterativo (bloque f2).

Finalmente, se reconstruye una imagen de FLIM (figura 2g) que muestra los mapas de los parámetros de fluorescencia finales (por ejemplo, Tau -constante de decaimiento) que cruzan la muestra.

Tal como resulta evidente para aquellos expertos en la materia, en la etapa de exploración f) el punto de la luz de excitación está limitado en cuanto a tamaño para iluminar un punto muy pequeño sobre la muestra, mientras que, en la etapa de segmentación d), el DMD ilumina típicamente áreas comparativamente mucho mayores.

Ejemplo adicional

A continuación se explicará un ejemplo más detallado del tratamiento de imágenes FLIM con exploración de trama con respecto a las figuras 3 y 4. Tal como se ha explicado previamente, se lleva a cabo preferentemente una calibración preliminar para establecer una correlación espacial entre el espécimen/muestra y el DMD, lo cual permite conocer de manera precisa las coordenadas de muestra (en el dispositivo de imágenes) que se corresponden con las del DMD. Esto se logra, por ejemplo, proyectando un rectángulo definido por un par de coordenadas de DMD ($X_1^{DMD}, Y_1^{DMD}; X_2^{DMD}, Y_2^{DMD}$) sobre la muestra homogéneamente fluorescente. La extracción de las esquinas del rectángulo ($X_1^F, Y_1^F; X_2^F, Y_2^F$) sobre la imagen de fluorescencia adquirida con la cámara, permite convertir coordenadas sobre la muestra simple en coordenadas respectivas de espejos del DMD y a la inversa. Esta etapa permite un control ventajoso de la adquisición y el análisis posteriores de datos.

En la siguiente etapa, se adquiere una imagen de fluorescencia de la muestra completa. Esto se logra conmutando todos los espejos de DMD a la posición ON durante el tiempo requerido para registrar la imagen de fluorescencia. La imagen de fluorescencia en estado estable $I(x,y)$ ($x=0...1024, y=0...768$) se adquiere con el fin de obtener distribución espacial de la información espectral y esto se puede lograr ya sea con un filtro dicróico pasoalto y una cámara de color, o una cámara de blanco y negro combinada con un conjunto de 2 o más filtros dicróicos pasabanda, una cámara intensificada con un filtro pasabanda sintonizable o cualquier otro dispositivo de tratamiento espectral de

imágenes. La imagen se puede adquirir típicamente en menos de unas pocas decenas de microsegundos (muestras teñidas) hasta unos pocos segundos (autofluorescencia).

5 A título de ejemplificación, considérese un ejemplo de imagen de fluorescencia en estado estable $I(x,y)$ en la figura 3, adquirida con un filtro pasoalto y una cámara CCD de color. Se puede considerar el espacio de color de HSL (Tono-Saturación-Luminancia), puesto que la información espectral (Tono) está separada con respecto al plano de intensidad (Luminancia). El histograma de Tonos representa componentes de tono disponibles en la imagen y subdividiendo el histograma en un número N_r de clases de tono H_r ($r=1..N_r-1$, $H_0=0$, $H_{N_r}=255$, $H_r < H_{r+1}$) se pueden enmascarar regiones, en las que la muestra presenta propiedades espectrales similares. Dentro de una clase de Tono individual, se puede llevar a cabo adicionalmente una segmentación de la intensidad, aunque para mantener la explicación a un nivel sencillo, nos centraremos únicamente en la segmentación del tono. Se crea un mapa (del tamaño correspondiente al tamaño de la matriz del DMD) de segmentos de Tono $S_r = \{S(x,y)=r; r = 1..N_r\}$, y cada píxel dentro del mapa se atribuye a una clase de tono definida con el siguiente algoritmo

$$\begin{aligned}
 & \text{para } (r = 1; r < N_r; r = r + 1) \\
 & S(x, y) = \begin{cases} 0 & I(x, y) > H_r \cap I(x, y) \leq H_{r-1} \\ r^* & H_{r-1} < I(x, y) \leq H_r \end{cases} \quad (1)
 \end{aligned}$$

15 donde r es el índice de intervalos de Tonos sucesivos, y H_r designa bordes de esos intervalos.

20 Adicionalmente se crean máscaras binarias B_r ($r=1..N_r$), que son las colecciones de píxeles pertenecientes al mismo intervalo de Tonos $B_r = \{S(x,y)=r\}$, donde r^* en la ecuación Ec. 1 adopta el valor "255" (correspondiente al estado ON del píxel del DMD).

25 A continuación, las máscaras binarias se envían secuencialmente al iluminador de DMD (tabla de la figura 3), sobre la muestra se excitan segmentos respectivos y simultáneamente se registran los fotones de fluorescencia. Analizando la muestra segmento a segmento, se recoge un número N_r de histogramas de decaimiento y los mismos se analizan para extraer constantes de decaimiento τ_r y para crear la tabla de referencia T_r que contiene parámetros del modelo de decaimiento esperado $T_r = \{\tau_r\} (r=1..N_r)$. En el caso de dos decaimientos exponenciales, se pueden extraer y almacenar cualesquiera otros parámetros (como la relación A entre componente corto y largo, valores de constantes de decaimiento corta τ_1 y larga τ_2 $T_r = \{A, \tau_1, \tau_2\}$) que modelen de manera fiable el conjunto de datos experimental dentro de la máscara. De esta manera, los segmentos de Tono S_r y consecuentemente cada píxel individual (x,y) se refiere a la tabla T_r . Los parámetros almacenados en la tabla T_r son los valores ajustados a partir de histogramas de decaimiento de fluorescencia que se promedian sobre los píxeles definidos por las máscaras B_r (en este caso el término "promedian" significa que se trata de un valor para una región y no debe entenderse en un sentido estadístico).

35 Al producirse la determinación de los parámetros de decaimiento esperados, se lleva a cabo la exploración de trama de la muestra completa (fig. 4 rama FLIM) para determinar parámetros de tiempo de vida de fluorescencia más precisos y con resolución espacial usando los parámetros de decaimiento esperados, determinados previamente, como Parámetros Iniciales Buenos.

40 Con respecto al presente ejemplo, los parámetros del modelo de decaimiento almacenados en la tabla T_r sirven como Parámetros Iniciales Buenos (GIP) para la posterior exploración de trama píxel a píxel y el ajuste y el análisis en línea. La conmutación del espejo de DMD de (x,y) a ON permite recoger el histograma de decaimiento de fluorescencia $I_{exp}(x,y,t)$. A los parámetros de ajuste iniciales se les puede hacer referencia por medio de $T_{S(x,y)}$. Ya se demostró que los algoritmos de ajuste a los que se les suministraban GIP convergían a soluciones fiables de manera mucho más rápida que en el caso sin entrenamiento (suposición total). Puesto que las curvas de decaimiento del modelo

$$I_m^i(t) = [A \cdot \exp(-t/\tau_1^i) + (1 - A) \cdot \exp(-t/\tau_2^i)] \otimes IRF(t, t_0) \quad (2)$$

50 para todos los segmentos ($i=1..N_s$) y todos los píxeles ($I_m^{S(x,y)}$) son conocidas antes de la exploración de trama (debido a la etapa presentada en la figura 3) se puede hacer que a la etapa de ajuste le preceda la resolución de un problema lineal

$$I_{exp}(x, y, t) = c(x, y) \cdot I_m^{S(x,y)}(t) + I_{bk}(x, y) \quad (3)$$

55 El hallazgo de la constante $c(x,y)$ mediante la resolución de

$$c(x, y) = \left\langle \frac{I_{\text{exp}}(t) - I_{bk}(x, y)}{I_m^{S(x, y)}(t)} \right\rangle \quad (4)$$

5 permite calcular también la bondad del ajuste (GOF) entre el modelo y el decaimiento experimental. Cuando la GOF obtenida es satisfactoria, no se requieren más etapas y $A(x, y) = T^A_{S(x, y)}$, $\tau_1(x, y) = T^{\tau_1}_{S(x, y)}$, $\tau_2(x, y) = T^{\tau_2}_{S(x, y)}$. Si no, los números almacenados en la tabla T_r sirven como GIP para un posterior ajuste de convolución iterativo. Un procedimiento $Ajuste(D_i, P = \{A, \tau_1, \tau_2\})$ entrega el modelo de decaimiento con el mejor ajuste optimizando un conjunto de coeficientes $\{A, \tau_1, \tau_2\}$ para minimizar los parámetros GOF definidos como

$$GOF(P) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1..N} \frac{(D_i - Ajuste(D_i, P))^2}{D_i} \quad (5)$$

10

donde D_i es el histograma de decaimiento experimental.

15 En otro ejemplo el procedimiento antes descrito es el mismo, aunque los parámetros de fluorescencia esperados, que se recogen tal como se presenta en la figura 3, se usan como parámetros de fluorescencia finales (figura 4, rama SFLIM) y no se lleva a cabo ninguna exploración de trama adicional.

REIVINDICACIONES

1. Método de tratamiento de imágenes por fluorescencia que comprende:
 - 5 a) iluminar una muestra (12) para excitar su fluorescencia y adquirir una imagen de la misma;
 - b) basándose en la información espacial y espectral de fluorescencia de la imagen de fluorescencia de la muestra, segmentar la imagen en regiones de propiedades espectrales similares (b2);
 - 10 c) para cada segmento de imagen, excitar la fluorescencia de la región de muestra correspondiente, y detectar la fluorescencia correspondiente (d2);
 - d) basándose en un modelado, determinar parámetros de fluorescencia esperados a partir de las señales de fluorescencia detectadas para cada región;
 - 15 e) explorar la muestra (12) y determinar parámetros de fluorescencia finales sobre la base de dichos parámetros de fluorescencia esperados de la etapa d).
2. Método según la reivindicación 1, en el que dichos parámetros de fluorescencia finales se determinan por medio de un algoritmo o algoritmos de ajuste que usan los parámetros de fluorescencia esperados como parámetros iniciales.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa e) implica la exploración, preferentemente exploración de trama (f1), de la muestra completa (12) usando un haz de luz de excitación, puntual, y la detección de la fluorescencia emitida por medio de un fotodetector (20) dedicado a la detección de tiempos de vida de fluorescencia o espectros de fluorescencia.
- 25 4. Método según la reivindicación 1, 2 o 3, en el que dicha etapa de exploración e) implica la detección de información espectral y/o de intensidad y/o información temporal de fluorescencia y/o información de polarización de fluorescencia para cada punto explorado.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos parámetros de fluorescencia esperados, respectivamente parámetros de fluorescencia finales, comprenden por lo menos un parámetro de tiempo de vida o de espectro de fluorescencia.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa c) implica la iluminación de cada región por medio de un dispositivo generador de patrones de luz de excitación (16) y la detección de la fluorescencia emitida por medio de un fotodetector (20) que genera dichas señales de fluorescencia.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa de calibración preliminar, en el que se establece una correlación espacial entre el área que es iluminada por el dispositivo generador de patrones de luz de excitación (16) y la imagen detectada correspondiente.
- 45 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de segmentación b) se basa adicionalmente en intensidades detectadas.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa e), dichos parámetros de fluorescencia finales se determinan mediante modelado a partir de los datos de fluorescencia explorados y usando dichos parámetros de fluorescencia esperados como información *a priori* para dicho modelado.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional f) de construir una imagen de tiempo de vida de fluorescencia o espectro de fluorescencia que proporciona un mapa de los parámetros de fluorescencia finales para la muestra analizada (12).
- 55 11. Método de tratamiento de imágenes por fluorescencia, que comprende:
 - a) iluminar una muestra (12) para excitar su fluorescencia y adquirir una imagen de la misma;
 - b) basándose en información espacial y espectral de fluorescencia de la imagen de fluorescencia de la muestra, segmentar la imagen en regiones de propiedades espectrales similares;
 - 60 c) para cada segmento de imagen, excitar la fluorescencia de la región de muestra correspondiente, y detectar la fluorescencia correspondiente;
 - d) basándose en un modelado, determinar parámetros de fluorescencia a partir de las señales de fluorescencia detectadas para cada región;
 - 65

e) construir imágenes por tiempos de vida de fluorescencia o espectros de fluorescencia que proporcionan un mapa de los parámetros de fluorescencia correspondientes a dichos parámetros de fluorescencia de la etapa d).

5 12. Programa de ordenador que comprende unos medios de código de programa de ordenador adaptados para llevar a cabo el método que tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores cuando dicho programa se ejecuta en un ordenador.

10 13. Producto de programa de ordenador que comprende unos medios de código de programa almacenados en un soporte legible por ordenador para llevar a cabo el método tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 cuando dicho producto de programa se ejecuta en un ordenador.

15 14. Sistema de tratamiento de imágenes por fluorescencia (10), para analizar una muestra (12), y dispuesto para llevar a cabo el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:

- una fuente de luz de excitación (14);
- un dispositivo generador de patrones de luz de excitación (16) iluminado por dicha fuente de luz de excitación (14) y con capacidad de producir patrones de luz sobre una muestra (12) a analizar;
- un dispositivo de tratamiento de imágenes (18) que produce imágenes de fluorescencia de campo completo con información espectral;
- un fotodetector (20) para detectar fluorescencia emitida por un punto o región excitado sobre la muestra (12);
- unos medios de control programables (22) para controlar dicho dispositivo generador de patrones de luz de excitación (16) y adquirir datos experimentales a partir de dicho dispositivo de tratamiento de imágenes (10) y dicho fotodetector (20).

30

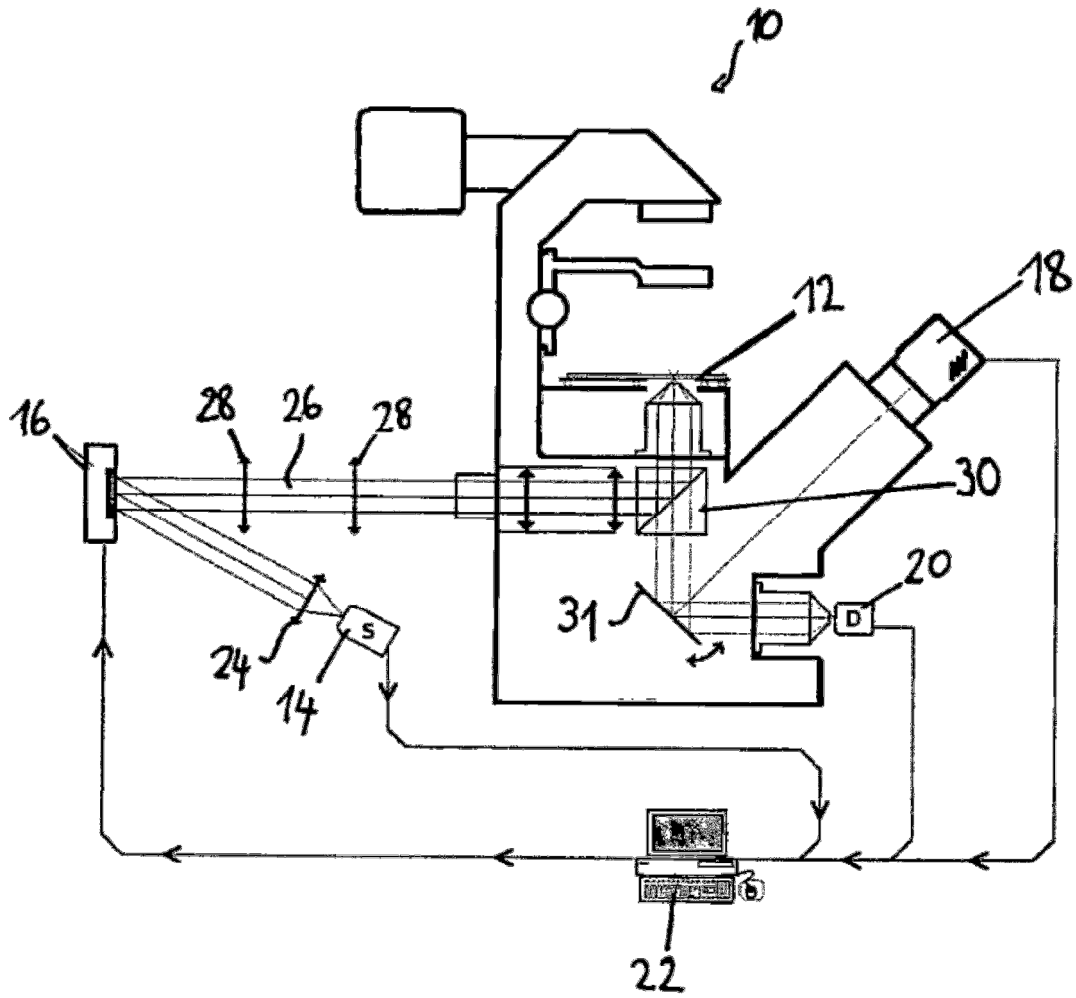


Fig. 1

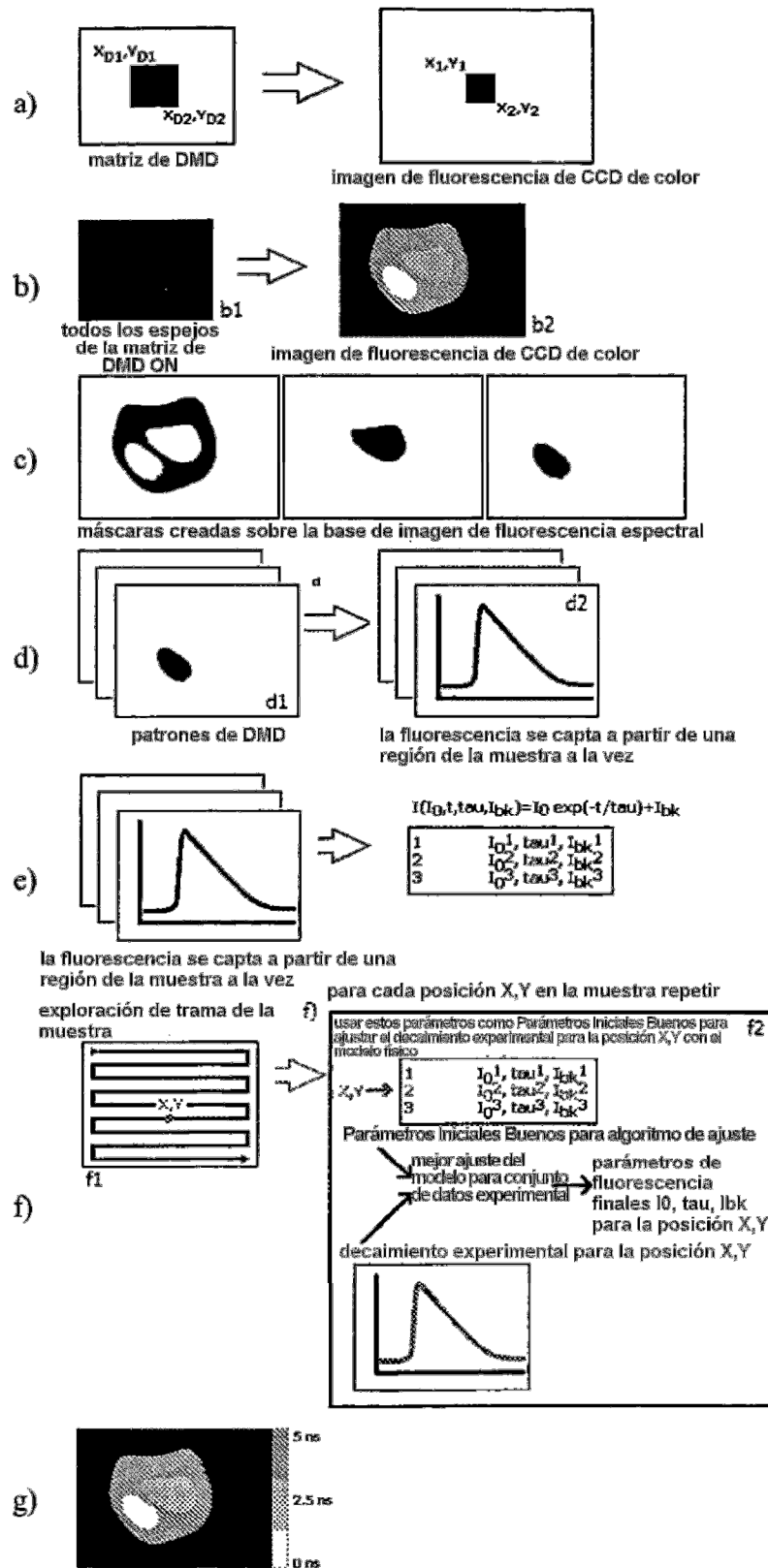


Fig.2

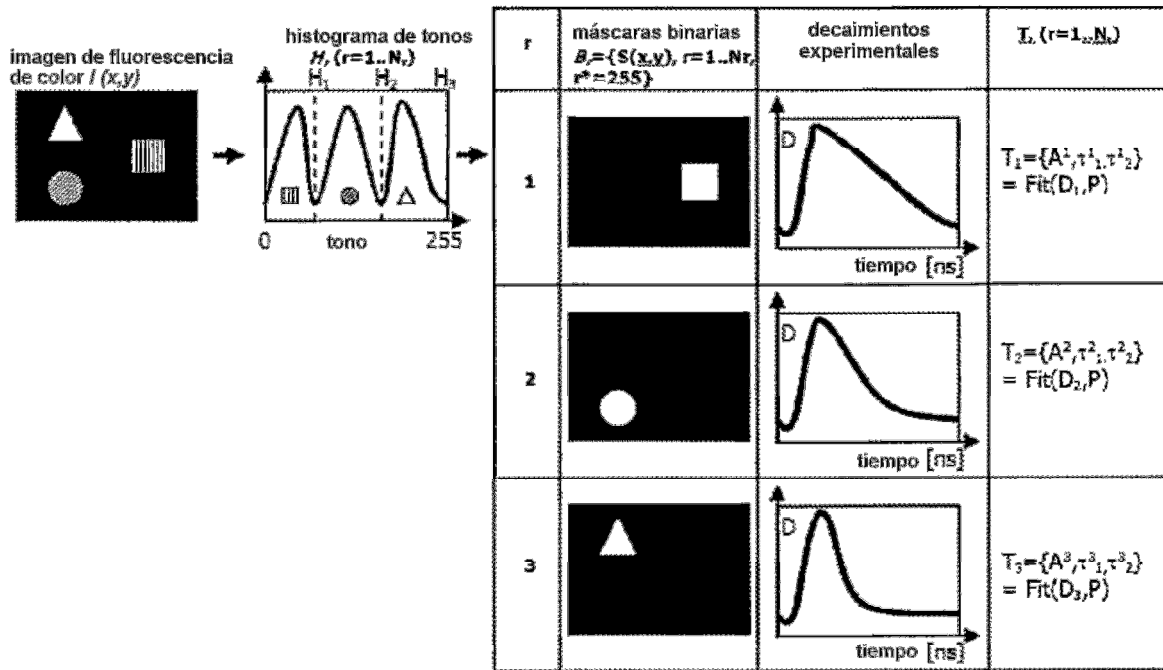


Fig.3

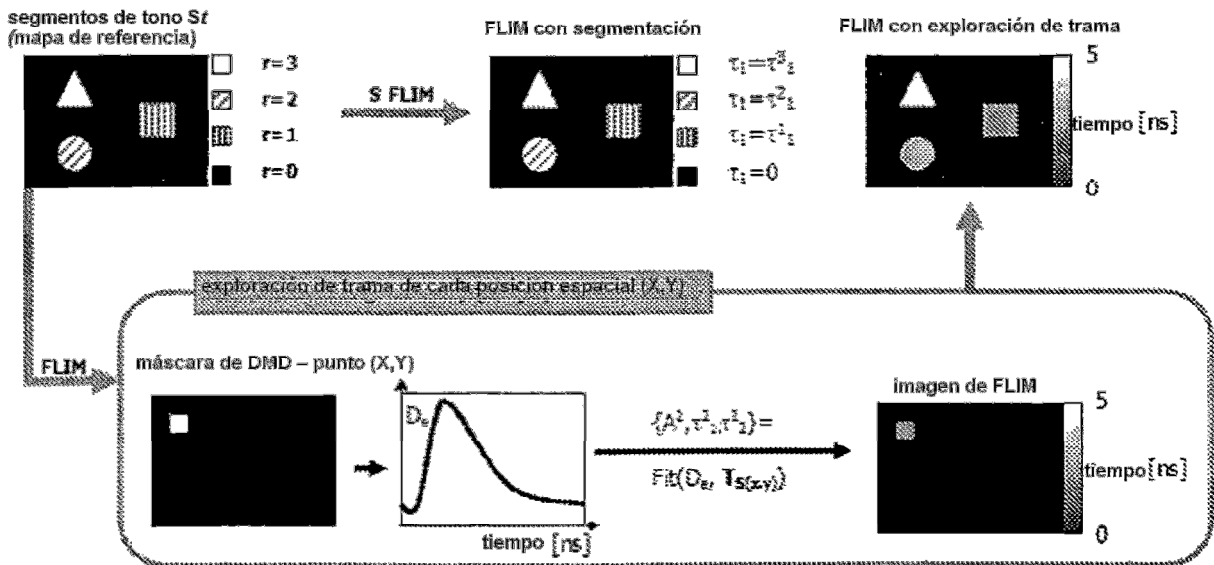


Fig.4