

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 675**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

G01B 9/04 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/EP2015/055800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15712839 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 3123228**

54 Título: **Microscopio confocal con correlación de apertura**

30 Prioridad:

24.03.2014 DE 102014004249

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

17.11.2017

73 Titular/es:

**CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH (100.0%)
Carl-Zeiss-Promenade 10
07745 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**LANGHOLZ, NILS;
DRESCHER, VIKTOR;
LIPPERT, HELMUT y
SCHWERDTFEGER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 675 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

Microscopio confocal con correlación de apertura.

La invención concierne a un microscopio confocal con correlación de apertura según el preámbulo de la reivindicación 1, así como a un procedimiento y un software para su funcionamiento.

- 5 Una ventaja principal de la microscopia confocal reside en que, debido a la desviación de la luz que viene de fuera del plano focal, es posible una toma fotográfica en capas de un objeto a observar con un contraste mejorado en las distintas capas. Esto hace posible la reconstrucción de una estructura tridimensional del objeto.

- 10 En el estado de la técnica se conocen diferentes procedimientos de microscopia confocal. El más difundido es ciertamente el de la microscopia confocal de exploración con láser (laser scanning confocal microscopy). Debido a la toma fotográfica de puntos individuales de una muestra, realizada por exploración (pixel a pixel), se necesita un tiempo relativamente largo para generar una imagen completa.

Se conocen también sistemas de exploración en los que se captan varios puntos en paralelos. Estos sistemas son caros debido al empleo de luz láser. Además, la luz láser posee solamente un espectro de banda estrecha, con lo que están limitadas las evaluaciones espectrales de informaciones de imagen.

- 15 El algoritmo de software para desmodular los datos brutos de la imagen tiene que filtrar la parte modulada de la señal y contabilizar varias imágenes procedentes de diferentes posiciones de máscara para obtener una imagen total.

- 20 En la correlación de apertura se utilizan las ventajas de la velocidad en la toma de imagen que resultan del empleo de un disco rotativo confocal. Sin embargo, en este caso se evitan al mismo tiempo las desventajas que resultan del empleo de un disco rotativo confocal o, por ejemplo, una máscara de hendiduras de exploración lateral. En la correlación de apertura se acepta la diafonía perturbadora – luz que vulnera la confocalidad debido a que ésta atraviesa en la detección un estenopo (pinhole) diferente de la que atraviesa durante la exposición a la luz. En la correlación de apertura se elimina virtualmente la diafonía debido a la contabilización con la imagen no confocal. En un disco rotativo confocal esta diafonía se traduciría, en último término, en artefactos ópticos que se depositan también en la topografía que se debe calcular más tarde.

- 25 Este procedimiento se encuentra descrito también en el documento DE 697 04 54 T2. Se toman, se restan y se representan siempre sucesivamente las imágenes de las diferentes secciones (imágenes compuestas e imágenes de campo amplio). Dado que la toma sucesiva de una imagen compuesta y una imagen de campo amplio se efectúa durante un giro del disco y únicamente después se realiza la resta, la secuencia de reproducción puede ser a lo sumo la mitad de la secuencia de toma de imagen. No es así posible la representación de imágenes vivas.

- 30 En el documento US 6.341.035 B1 se muestra un procedimiento según el principio anteriormente descrito, con el cual es posible una visualización de imágenes vivas. En este procedimiento se contabilizan siempre una con otra la imagen más reciente y la imagen tomada directamente antes. Se establece para ello cada vez si la imagen más reciente es una imagen compuesta o una imagen de campo amplio y, dependiendo de esto, se determina la dirección de resta. Diferentes señales de disparo controlan la toma y procesamiento de imágenes. En la zona del borde del disco están previstos unos marcadores que permiten la determinación de la naturaleza de las imágenes parciales. No se ha descrito aquí una extracción de características espaciales de un objeto, ya que la visualización de imágenes vivas se efectúa únicamente en un plano focal.

- 35 Partiendo del estado de la técnica, el problema de la invención consiste en perfeccionar un microscopio confocal con correlación de apertura en el sentido de que se haga posible de manera sencilla la confección de una topografía o la generación de una toma fotográfica apilada.

El problema se resuelve con un microscopio dotado de las características de la reivindicación 1, un procedimiento dotado de las características de la reivindicación 2 y un programa informático dotado de las características de la reivindicación 9.

- 40 Un microscopio confocal según la invención comprende primeramente, de manera conocida, un dispositivo de iluminación para iluminar una muestra que puede colocarse sobre una platina portaobjetos. El dispositivo de iluminación puede ser, por ejemplo, una iluminación convencional, tal como la que es conocida para microscopios de campo amplio. La platina portaobjetos está formada preferiblemente de manera desplazable en el plano horizontal y en sentido vertical. Como alternativa o adicionalmente, puede estar previsto un accionamiento de foco en un objetivo para la variación del foco.

45 Entre el dispositivo de iluminación y la platina portaobjetos está prevista una unidad de disco rotativo que trabaja y está constituida de una manera también conocida. La unidad de disco rotativo comprende una máscara de apertura rotativa con una primera sección ópticamente abierta y al menos una segunda sección estructurada para codificar la

iluminación, tal como esto se encuentra descrito, por ejemplo, en el documento DE 697 04 54 T2.

La radiación reflejada o emitida por la muestra es descodificada por medio del objetivo a través de la máscara de apertura o una máscara descodificadora construida de la misma manera y es captada por una unidad de toma de imagen.

5 A través de la primera sección se capta por la unidad de toma de imagen una primera imagen (imagen de campo amplio), mientras que a través de la segunda sección se descodifica y se capta una segunda imagen (denominada imagen compuesta). La imagen compuesta, además de contener las porciones confocales, contiene también porciones de la imagen de campo amplio. Por tanto, la imagen de campo amplio tiene que ser restada generalmente de la imagen compuesta para obtener la imagen confocal.

10 Este y otros pasos de procesamiento se realizan para la generación de la imagen confocal en la unidad de procesamiento de imagen con un procedimiento según la invención.

La invención comprende también un programa de procesamiento de datos con medios de código de programa que se puede ejecutar en una imagen de procesamiento de imágenes de un microscopio confocal de tipo genérico para realizar los pasos del procedimiento según la invención.

15 Ventajosamente, el programa de procesamiento de datos puede implementarse también en una unidad de procesamiento de imágenes de un microscopio confocal de tipo genérico (por ejemplo como actualización de firmware) para confeccionar topografías de muestras. A este fin, el programa presenta una interfaz de comunicación con una unidad de control del microscopio para leer o activar posiciones de foco.

20 Para generar una topografía de la muestra son adecuadas imágenes apiladas que se toman en posiciones de foco verticales diferentes. Las posiciones de foco verticales diferentes pueden ser ajustadas por desplazamiento vertical de la platina portaobjetos y/o por ajuste de foco del objetivo (accionamiento de foco). De esta manera, se pueden representar especialmente estructuras geométricas, cantos, etc. con una nitidez de profundidad ampliada.

Esto rige especialmente para la representación de superficies técnicas, por ejemplo para establecer valores característicos de rugosidad.

25 Según la invención, durante la toma de imagen se desplazan entonces continuamente la platina portaobjetos y/o el accionamiento de foco en dirección vertical, mientras que se captan continuamente alternando las primeras y las segundas imágenes. Se almacena entonces como metadato para cada imagen la posición de foco de la platina portaobjetos y/o del accionamiento de foco en el momento de la toma, habiéndose captado o preajustado preferiblemente dicha posición de foco con un medio de captación de posición.

30 Este almacenamiento puede efectuarse para las diferentes clases de imagen en pilas separadas o conjuntas.

35 Para el cálculo de una imagen confocal en una posición de foco determinada se contabilizan siempre tres de las imágenes continuamente tomadas, interpolándose dos primeras imágenes (de campo amplio) o dos segundas imágenes (compuestas) para obtener una imagen intermedia y contabilizándose éstas con una imagen del otro tipo de imagen correspondiente (segunda o primera imagen) para obtener una imagen confocal que se almacena con una pila de imágenes preferiblemente junto con la posición de foco pertinente como metadato. Por supuesto, hay que tener en cuenta en este caso la dirección de resta (imagen compuesta MENOS imagen de campo amplio).

40 La topografía de la muestra puede establecerse ahora de manera conocida a partir de las imágenes confocales en diferentes posiciones de foco. La topografía resulta entonces de la evaluación de la intensidad a lo largo de la dirección de apilamiento. La actuación para ello se encuentra descrita, por ejemplo, en R. Leach: "Optical Measurement of Surface Topography".

Las ventajas de la invención pueden verse especialmente en que es posible de manera rápida y sencilla calcular imágenes confocales para posiciones de foco diferentes, sin que haya que permanecer para ello siempre en una posición de foco, lo que conduce, especialmente en tomas de imagen apiladas, a una sensible reducción del tiempo de medida total.

45 Ejecuciones preferidas de la invención están indicadas en las reivindicaciones subordinadas.

En la toma de imágenes se pueden emplear variantes diferentes.

En una forma de realización preferida de la invención se toman alternando unas imágenes primeras y segundas en una pila mixta. El número de ambas clases de imagen no tiene que coincidir en este caso.

50 Como alternativa, la toma de las imágenes primeras y segundas se efectúa en pilas separadas, es decir que existe una pila de campo amplio (primeras imágenes) y una pila compuesta (segundas imágenes). Las tomas pueden

almacenarse o guardarse entonces en la pila con una dirección idéntica o contraria.

Para mejorar la exactitud puede ser ventajosa emplear más de una pila compuesta y/o más de una pila de campo amplio y/o más de una pila mixta.

5 Para el cálculo de la imagen intermedia para la respectiva posición de foco deseada pueden interpolarse las segundas imágenes (compuestas) sobre la posición de las imágenes de campo amplio, o viceversa. Es posible también interpolar imágenes primeras y segundas sobre nuevas posiciones conjuntas o combinar las posibilidades anteriormente citadas. La imagen intermedia aquí definida no tiene ninguna referencia con las imágenes intermedias conocidas por sistemas ópticos. Sirve aquí únicamente como “estación intermedia” entre dos o más pasos de tratamiento.

10 Para el cálculo de la imagen confocal se emplean al menos tres imágenes, siendo necesarias al menos dos imágenes del mismo tipo y al menos una imagen del otro tipo.

15 La generación de la imagen intermedia se efectúa mediante una interpolación adecuada de tipos cualesquiera. El experto puede seleccionar la interpolación adecuada para ello. A modo de ejemplo, se citan aquí: interpolación polinómica, interpolación spline de grados diferentes, interpolación de vecinos más próximos, interpolación de Shepard e interpolación de Akima. Son posibles también extrapolaciones.

La regulación vertical de la platina portaobjetos y/o del accionamiento de foco se efectúa preferiblemente de manera continua, pero puede variarse también en otras formas de realización de la invención; por ejemplo, para la toma de imagen se pueden alcanzar posiciones de foco fijas predeterminadas con o sin empleo de un bucle de regulación, las cuales se almacenan con los datos de imagen.

20 Los datos de posición para la posición de foco pueden obtenerse de todas las maneras imaginables: mecánicamente mediante sistemas codificados, medición de distancia óptica, acústica o magnética o capacitiva. Es posible también el empleo de color para obtener la posición del foco, tal como, por ejemplo, en el caso de la microscopia cromáticamente confocal (exploración lambda).

25 La velocidad del avance vertical y, por tanto, la distancia vertical entre las imágenes pueden ser iguales o diferentes para las imágenes compuestas y las imágenes de campo amplio. Como alternativa, es posible adaptar la tasa de cuadros de la cámara.

El procedimiento según la invención puede combinarse también con la correlación de apertura cromática que se ha descrito en el documento DE 10 2012 007 045 A1.

30 Asimismo, es posible emplear varios sensores para la toma de imágenes en formas de realización modificadas. Las tomas no tienen que realizarse entonces de manera forzosamente síncrona.

A continuación, se explican con más detalle variantes preferidas del procedimiento según la invención ayudándose de las figuras. Muestran en éstas:

La figura 1, una representación esquemática de una primera variante de un procedimiento según la invención en una imagen de campo amplio interpolada como imagen intermedia;

35 La figura 2, una representación esquemática de una segunda variante de un procedimiento según la invención con una imagen compuesta interpolada como imagen intermedia;

La figura 3, una representación esquemática de una tercera variante de un procedimiento según la invención con imágenes intermedias de naturalezas diferentes; y

40 La figura 4, una representación esquemática de una cuarta variante de un procedimiento según la invención en una posición de foco cualquiera.

En las figuras 1 a 4 se representan esquemáticamente desarrollos de variantes diferentes del procedimiento según la invención. Un movimiento vertical de una platina portaobjetos y/o un accionamiento de foco está representado siempre como eje z 01. Se han identificado diferentes posiciones de foco z1, z2 ... z7 y za en el eje z 01.

45 Según la invención en las respectivas posiciones de foco z1 ... z7 se captan alternadamente unas imágenes de campo amplio 02 y unas imágenes compuestas 03 por medio de uno o varios sensores de imagen y se almacenan éstas con su respectiva posición de foco z1 ... z7 en una pila de imágenes 04. Por supuesto, para este almacenamiento se pueden emplear también varias pilas de imágenes. Las posiciones de foco pueden alcanzarse de una manera definida o pueden captarse con un movimiento continuo de la platina.

50 En una primera variante según la figura 1 se tiene que, para generar una imagen confocal 05 en la posición de foco z2, se interpolan en la unidad de procesamiento de imagen dos imágenes de campo amplio 02 – que se han captado

en otra posición Z z1 o z3, respectivamente – con medios de procesamiento de imagen conocidos para obtener una imagen intermedia de campo amplio 06 en la posición z2. La imagen confocal 05 de la posición de foco z2 se genera ahora de manera conocida por resta de la imagen intermedia de campo amplio 06 respecto de la imagen compuesta 03.

- 5 Se almacenan imágenes confocales 05 con sus posiciones de foco correspondientes z2, z4, z6 en una imagen apilada confocal 07.

- 10 En una segunda variante según la figura 2 se interpolan como imagen intermedia para la posición de foco z3 (o z5), en la que se presenta una imagen de campo amplio 02 en la pila de tomas 04, dos imágenes compuestas 03 que se presentan en posiciones de foco contiguas z2 y z4 (o z4 y z6) para obtener una imagen intermedia compuesta 08 en la posición de foco z3 (o z5). Las imágenes confocales 05 se calculan ahora cada una de ellas mediante una resta de la imagen de campo amplio en la posición de foco z3 (o z5) respecto de la imagen intermedia compuesta 08.

La tercera variante según la figura 3 es una combinación de las dos anteriormente descritas. Cada toma se utiliza tanto directamente como después de una interpolación para calcular una de las imágenes confocales 05. En esta variante se puede almacenar transitoriamente una pila mixta de imágenes intermedias 09.

- 15 En la figura 4 se representa el modo en que se puede generar una imagen confocal 05 para una posición de foco za, en la cual no se presentan como pertenecientes a ella ni una imagen de campo amplio 02 ni una imagen compuesta 03. Gracias a esta medida se puede aumentar la flexibilidad del procedimiento. En esta cuarta variante se interpolan las respectivas imágenes compuestas contiguas más próximas 03 en las posiciones z4 y z6 para obtener la imagen intermedia compuesta 08 y se interpolan las imágenes de campo amplio contiguas en las posiciones z3 y z5 para obtener una imagen intermedia de campo amplio 06. A partir de ambas imágenes intermedias 08, 06 se calcula por resta la imagen confocal 05.
- 20

Lista de símbolos de referencia

- 01 Eje z
 02 Imagen de campo amplio
 25 03 Imagen compuesta
 04 Pila de imágenes
 05 Imagen confocal
 06 Imagen intermedia de campo amplio
 07 Imagen apilada confocal
 30 08 Imagen intermedia compuesta

REIVINDICACIONES

1. Microscopio confocal que comprende
- un dispositivo de iluminación para iluminar una muestra;
 - una unidad de disco rotativo que comprende una máscara de apertura rotativa con una primera sección ópticamente abierta y una segunda sección estructurada para codificar la iluminación;
 - una unidad de toma de imágenes para captar una primera imagen (02), que está asociada a la primera sección, y una segunda imagen (03), que está asociada a la segunda sección, a través de la máscara de apertura o una máscara descodificadora;
 - una platina portaobjetos verticalmente desplazable y/o un accionamiento de foco verticalmente desplazable con un medio de captación de posición para captar una posición vertical (z1... z7) de la platina portaobjetos y/o del accionamiento de foco;
 - una unidad de procesamiento de imágenes para generar una imagen confocal (05) por contabilización de las primeras y segundas imágenes (02, 03) asociadas a las secciones,
- caracterizado** por que la unidad de toma de imágenes está preparada para
- tomar primeras y segundas imágenes en posiciones verticales diferentes;
 - almacenar transitoriamente las primeras y las segundas imágenes (02, 03) con su respectiva posición vertical correspondiente (z1 ... z7); y
 - interpolar dos primeras imágenes (02) o dos segundas imágenes (03) para obtener una imagen intermedia (06 o 08) y, teniendo en cuenta la posición vertical (z1 ... z7), generar con la segunda imagen (03) o la primera imagen (02) una imagen confocal (05) de una muestra colocada sobre la platina portaobjetos;
 - establecer la topografía de la muestra a partir de más de dos imágenes confocales en diferentes posiciones de foco.
2. Procedimiento para determinar una topografía de una muestra por medio de un microscopio confocal según la reivindicación 1, que comprende los pasos siguientes:
- mover verticalmente una platina portaobjetos y/o un accionamiento de foco durante una captación alternativa de imágenes primeras y segundas de una muestra colocada sobre la platina portaobjetos, almacenándose para cada imagen una posición de foco vertical como metadato;
 - interpolar dos imágenes primeras o segundas para obtener una imagen intermedia;
 - generar una imagen confocal para la posición vertical determinada por contabilización de la imagen intermedia con la segunda o la primera imagen en la posición;
 - establecer la topografía de la muestra a partir de más de dos imágenes confocales en posiciones de foco diferentes.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que se forma la topografía mediante una pila de más de dos imágenes confocales.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que, para interpolar la imagen intermedia en una posición de foco determinada, se emplean dos primeras o segundas imágenes de las posiciones de foco contiguas a la posición de foco determinada.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que la captación de primeras y segundas imágenes se efectúa en memorias o secciones de memoria separadas.
6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que se alcanzan con la platina portaobjetos posiciones de foco verticales predeterminadas.
7. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que se mueve continuamente la platina portaobjetos durante la toma de imágenes y se capta la posición de foco perteneciente a cada imagen con ayuda de un medio de captación de posición.
8. Programa de procesamiento de datos para su ejecución en una unidad de procesamiento de imagen de un microscopio confocal según la reivindicación 1, **caracterizado** por que comprende órdenes de programa codificadas

para poner en práctica un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

9. Programa de procesamiento de datos según la reivindicación 8, **caracterizado** por que comprende una interfaz de comunicación con una unidad de control del microscopio para leer o activar posiciones de foco.

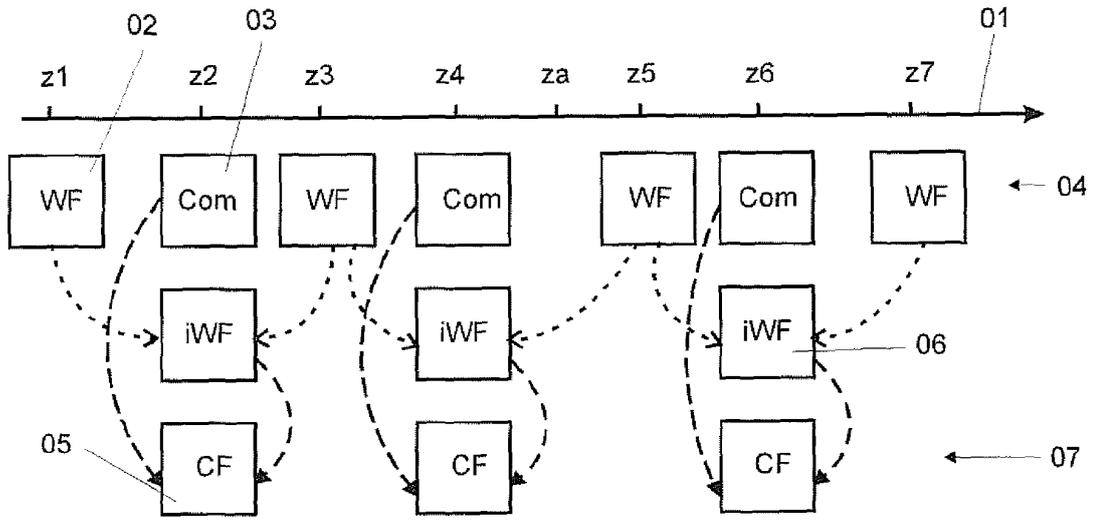


Fig. 1

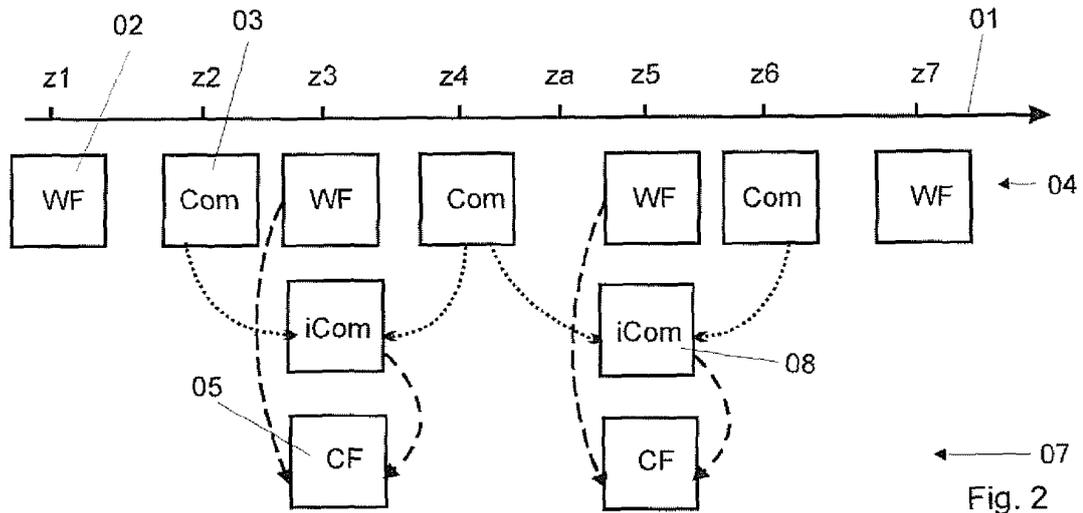


Fig. 2

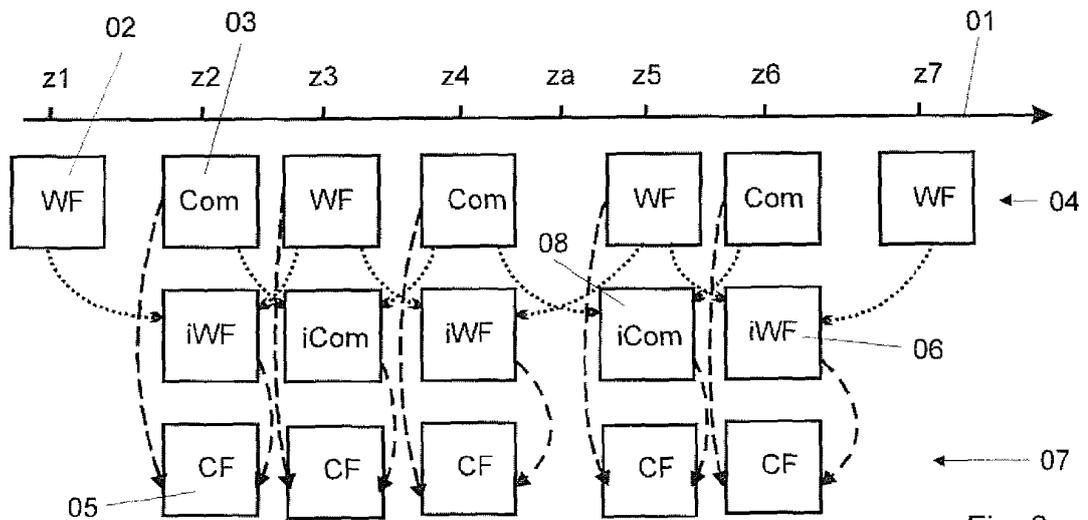


Fig. 3

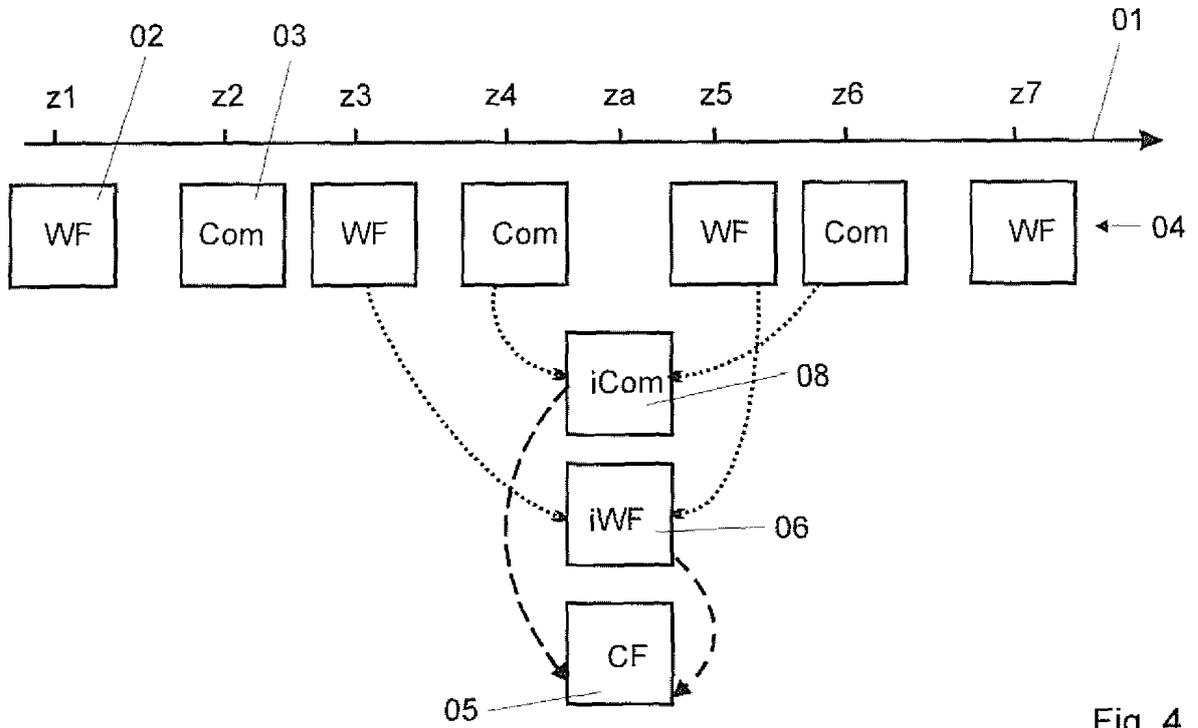


Fig. 4